

**ONDERZOEK NAAR INFEKTIES  
MET COXSACKIE A 21-VIRUS**

---

**K. G. OEI**





**ONDERZOEK NAAR INFEKTIES  
MET  
COXSACKIE A 21-VIRUS**

**PROMOTOR:**

**PROF. DR. J. VAN DER VEEN**

# ONDERZOEK NAAR INFEKTIES MET COXSACKIE A 21-VIRUS

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. S. J. GEERTS,  
HOOGLERAAR IN DE FACULTEITEN DER GENEESKUNDE  
EN DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN,  
VOLGENS HET BESLUIT VAN DE SENAAT  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP 1 JULI 1966  
DES NAMIDDAGS TE 2 UUR

DOOR

OEI KIEM GIOK

GEBOREN TE SEMARANG

Centrale Drukkerij n.v., Nijmegen



*Aan mijn Moeder*

## INHOUD

Inleiding . . . . .	9
---------------------	---

### Hoofdstuk I

<i>Literatuuroverzicht</i> . . . . .	10
1.1. Historisch overzicht . . . . .	10
1.2. Enterovirussen . . . . .	10
1.2.1. Eigenschappen van enterovirussen . . . . .	10
1.2.2. Indeling van enterovirussen . . . . .	11
1.3. Coxsackie-virussen . . . . .	13
1.3.1. Biologische eigenschappen . . . . .	13
1.3.2. Antigene eigenschappen . . . . .	14
1.4. Coxsackie A 21-virus (enterovirus 24) . . . . .	17
1.4.1. Enkele eigenschappen van Coxsackie A 21-virus . . . . .	17
1.4.2. Pathogeniteit voor de mens . . . . .	22
1.4.3. Epidemiologische gegevens . . . . .	25

### Hoofdstuk II

<i>Materiaal en methoden</i> . . . . .	30
2.1. Celkweken . . . . .	30
2.1.1. Verse celkweken . . . . .	30
2.1.2. Cellijnen . . . . .	30
2.1.3. Celstammen . . . . .	31
2.2. Media . . . . .	32
2.2.1. Kweekmedia . . . . .	32
2.2.2. Onderhoudsmedia . . . . .	32
2.3. Virologisch onderzoek . . . . .	33
2.4. Serologisch onderzoek . . . . .	34
2.4.1. Bereiding van virusantigenen . . . . .	34
2.4.2. Bereiding van antisera . . . . .	36
2.4.3. Neutralisatiereactie . . . . .	36
2.4.4. Komplementbindingsreactie . . . . .	37



2.4.5. Hemagglutinatie- en hemagglutinatieremmingsreactie	38
2.4.6. Serologische reactie met andere virussen . . . . .	40
2.5. Herkomst van het materiaal voor virologisch en serologisch onderzoek . . . . .	40

### Hoofdstuk III

<i>Onderzoek van enkele eigenschappen van Cocksackie A 21-virus . .</i>	<i>42</i>
3.1. Gevoeligheid van verschillende cellijnen voor Cocksackie A 21-virus . . . . .	42
3.2. Invloed van het onderhoudsmedium op de virusproductie in HeLa-cellen . . . . .	44
3.2.1. Vergelijking van sera van verschillende soorten dieren .	44
3.2.2. Vergelijking van media met verschillende samenstelling	45
3.3. Virusvermenigvuldiging in HeLa-cellen . . . . .	46
3.4. Vorming van hemagglutinenen in HeLa-cellen . . . . .	48
3.5. Hemagglutinatiereactie en hemagglutinatieremmingsreactie .	50
3.5.1. Invloed van de temperatuur op de hemagglutinatiereactie . . . . .	50
3.5.2. Invloed van de virusconcentratie op de hemagglutinatieremmingsreactie . . . . .	51
3.6. Ontwikkeling van antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus bij caviae . . . . .	52
3.6.1. Ontwikkeling van neutraliserende antistoffen . . .	52
3.6.2. Ontwikkeling van hemagglutinatieremmende antistoffen . . . . .	54

### Hoofdstuk IV

<i>Onderzoek van enkele methoden om infecties met Cocksackie A 21-virus aan te tonen . . . . .</i>	<i>55</i>
4.1. Overzicht van de uitkomsten van virologische en serologische onderzoeken op Cocksackie A 21-virus bij 83 patiënten . .	55
4.2. Isolatie van Cocksackie A 21-virus in verschillende celkweken	55
4.3. Vergelijking van enkele serologische reacties op antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus . . . . .	59
Beschouwing . . . . .	63

## Hoofdstuk V

<i>Epidemiologisch onderzoek naar infecties met Coxsackie A 21-virus</i>	67
5.1. Frekwentie van infecties met Coxsackie A 21-virus onder rekruten . . . . .	67
5.2. Morbiditeit van rekruten ten gevolge van infecties met Coxsackie A 21-virus . . . . .	71
5.2.1. Onderzoek in de periode oktober-november 1961 . . .	71
5.2.2. Onderzoek in de periode oktober 1962-maart 1964 .	73
5.3. Onderzoek naar infecties met Coxsackie A 21-virus bij kinderen met akute aandoeningen van de luchtwegen . . . . .	75
Beschouwing . . . . .	77
Samenvatting . . . . .	81
Summary . . . . .	85
Literatuurlijst . . . . .	89

## INLEIDING

Akute aandoeningen van de luchtwegen worden voor een groot deel veroorzaakt door virussen. Belangrijke verwekkers van respiratoire aandoeningen behoren tot de adeno- en myxovirusgroep. Van de picornavirusgroep zijn rhinovirussen verantwoordelijk voor verkoudheid. Slechts enkele typen van de enterovirusgroep zijn met akute aandoeningen van de luchtwegen in verband gebracht.

In 1958 werden virusstammen, die eigenschappen toonden van een enterovirus, bij 3 patiënten met een akute aandoening van de luchtwegen geïsoleerd (van der Veen e.m., 1960). Deze virusstammen waren identiek aan het „Coe virus”, dat door Lennette en medewerkers (1958) was beschreven en dat eveneens afkomstig was van een patiënt met een akute aandoening van de luchtwegen. Schmidt en medewerkers (1961) identificeerden het „Coe virus” als Cocksackie A 21-virus (enterovirus 24). Onderzoekers in de Verenigde Staten (Lennette e.m., 1958; Johnson e.m., 1962), Engeland (Pereira e.m., 1959; McDonald e.m., 1962), Nederland (van der Veen e.m., 1960), Japan (Fukumi e.m., 1961) en Zweden (Kjersgaard e.m., 1962) hebben mededelingen gedaan over het voorkomen van infecties met Cocksackie A 21-virus bij patiënten met milde respiratoire aandoeningen.

In dit onderzoek zijn enkele eigenschappen van het virus en enkele methoden om infectie met Cocksackie A 21-virus aan te tonen bestudeerd. Tevens werd een onderzoek ingesteld naar de betekenis van Cocksackie A 21-virus als oorzaak van luchtweginfecties bij militairen en bij kinderen.

Het onderzoek werd verricht bij militairen uit de legerplaats Ossendrecht. Het materiaal werd verkregen door medewerking van de geneeskundige staf aldaar. Het onderzoek bij kinderen werd verricht bij patiëntjes, die op de kinderafdelingen van het St. Radboud- en St. Canisius-Ziekenhuis te Nijmegen waren opgenomen. Materiaal en klinische gegevens van deze kinderen werden ons ter beschikking gesteld door Prof. Dr. J. P. Slooff en door L. Strengers, kinderarts. Nierweefsel werd ons welwillend ter beschikking gesteld door Prof. Dr. L. A. M. Stolte, schildklierweefsel door Prof. Dr. E. J. Moeys en door de chirurgen Dr. F. W. Mreyen en Dr. C. C. S. M. Wijffels te Tilburg. Het onderzoek vond plaats in het laboratorium voor de Gezondheidsleer van de Katholieke Universiteit te Nijmegen.

## LITERATUUROVERZICHT

## 1.1. Historisch overzicht

Lennette en medewerkers (1958) isoleerden in het najaar van 1954 en van 1956 tijdens een onderzoek op adenovirusinfekties bij militairen een aantal virusstammen, die serologisch geen verwantschap toonden met adenovirussen, herpes simplex-virus en de in die periode officieel geklassificeerde enterovirussen. De virusstammen werden gekweekt uit keelspoelsels van patiënten met een milde infectie van de bovenste luchtwegen. Serologisch waren de virusstammen aan elkaar identiek. Op grond van hun gedrag in celkulturen konden ze worden onderscheiden van andere respiratoire virussen, zoals influenza- en parainfluenzavirussen, adenovirussen, respiratoor syncytiaal virus en ECHO 28-virus (enterovirus 58). Het virus werd door de bovengenoemde onderzoekers als een nieuw, nog niet beschreven virus beschouwd, waaraan de naam „Coe virus” werd gegeven naar de eerste drie letters van één der patiënten (Lennette e.m., 1958).

Ook in andere landen bleken virussen te cirkuleren, die identiek waren aan „Coe virus”. In het begin van 1958 werden bij militairen in Engeland (Pereira e.m., 1959) en in Nederland (van der Veen e.m., 1960) respectievelijk vier en drie „Coe”-virusstammen geïsoleerd. Uit Japan (Fukumi e.m., 1961) volgde een kasuïstische mededeling over een infectie met „Coe”-virus bij een patiënt, die bij zijn werkzaamheden in nauw contact stond met een militair kamp.

„Coe”-virus zou aan de hand van morfologische, chemische en biologische kenmerken in de groep van de enterovirussen kunnen worden ondergebracht. Bij de uitbreiding van de Coxsackie A-virusgroep met 5 nieuwe typen (Sickles e.m., 1959) kon inderdaad worden vastgesteld, dat „Coe”-virus identiek was met één van deze nieuwe typen. In de neutralisatiereactie reageerden „Coe”-virus en Coxsackie A 21-virus (enterovirus 24) volkomen identiek (Schmidt e.m., 1961).

## 1.2. Enterovirussen

1.2.1. *Eigenschappen van enterovirussen.* Een groot aantal virussen, die tijdelijk in de tractus digestivus en in de nasofarynx kunnen voor-

komen, zijn ondergebracht in de groep van enterovirussen (Committee on the Enteroviruses, 1957). Naast de lokalisatie in de gastheer hebben deze virussen een aantal morfologische en fysisch-chemische eigenschappen gemeen.

De enterovirussen behoren tot de kleinere virussen met een diameter van 25-30 m $\mu$ . Met de elektronenmikroskoop zijn ze waar te nemen als ronde partikels. Door toepassing van de negatieve contrastmethode zijn de capsomeren zichtbaar gemaakt. Het aantal capsomeren bedraagt 32, die volgens een icosahedrale symmetrie zijn gerangschikt (Mayor, 1964). De kernsubstantie van deze groep van virussen blijkt ribonucleïnezuur (RNA) te zijn. De ongevoeligheid voor ether wijst op het ontbreken van lipoïden als een essentiële komponent.

Enterovirussen zijn weinig gevoelig voor temperatuur. Verhitting op 50-55° C gedurende 30 minuten in een waterig milieu vernietigt het virus. De infectiositeit van het virus blijft echter na 30 minuten op 50° C behouden, indien divalente kationen aan het milieu worden toegevoegd. De werking van divalente kationen op de stabiliteit van een virus zou volgens Wallis en medewerkers (1962) een eigenschap zijn die in verband staat met de fysisch-chemische structuur van het virus. Deze onderzoekers hebben het stabiliserende effect van divalente kationen onderzocht op een aantal soorten virussen met een verschillende moleculaire structuur (Horne e.m., 1961). De stabiliserende werking werd waargenomen bij „RNA”-virussen met een kubische structuur van eiwitten, zoals entero- en REO („Respiratory Enteric Orphan”)-virussen. In tegenstelling hiermee waren „RNA”-virussen met een helische structuur, zoals myxovirussen, en „desoxyribonucleïnezuur (DNA)”-virussen met een kubische of andere structuur van eiwitten, zoals adeno- en pokvirussen, in aanwezigheid van divalente kationen gevoeliger voor temperatuur.

1.2.2. *Indeling van enterovirussen.* Enterovirussen, die bij de mens worden gevonden, zijn te verdelen in 3 groepen: poliomyelitis-, Coxsackie- en ECHO („Enteric Cytopathogenic Human Orphan”)-virussen. De verdeling is gebaseerd op de afwijkingen, die deze virussen in dieren of weefselkweken veroorzaken. Poliomyelitisvirussen kenmerken zich door hun affiniteit voor het neurale weefsel van primaten, Coxsackie-virussen door een bijzondere pathogeniteit voor pasgeboren muizen en ECHO-virussen door het vermogen zich in vitro te vermenigvuldigen in cellen van primaten en het ontbreken van pathogeniteit voor laboratoriumdieren.

In deze drie groepen zijn een aantal typen ondergebracht, die immunologisch van elkaar verschillen. Tot op heden zijn meer dan 60 typen door de Panel for Picornaviruses (1963) officieel als enterovirus erkend. Hiervan zijn 3 typen in de poliomyelitisvirus-, 23 typen in de Coxsackie A-virus-, 6 typen in de Coxsackie B-virus- en 32 typen in de ECHO-virusgroep ondergebracht.

Naarmate echter meer virusstammen worden geïsoleerd en een beter inzicht wordt verkregen in de eigenschappen van virussen, blijkt een indeling volgens een kenmerk als de dier- en celpathogeniteit aanleiding te geven tot verwarring en onvoldaanheid. Deze biologische kenmerken bleken niet altijd konstant te zijn voor een groep of een type. De Committee on Enteroviruses (1962) heeft hierom voorgesteld de onderverdeling in 3 groepen aan de hand van pathogene eigenschappen te vervangen door een indeling volgens een numeriek systeem op grond van antigene eigenschappen. De officieel geklassificeerde typen poliomyelitis-, Coxsackie- en ECHO-virussen zouden achtereenvolgens als enterovirus 1 tot en met 65 kunnen worden aangeduid. Een nieuw virus, dat bij de mens is geïsoleerd, op fysisch-chemische gronden tot de enterovirusgroep behoort en in antigene eigenschappen verschilt van de officieel geklassificeerde typen, zou een hierop volgend rangnummer kunnen worden toegekend. Coxsackie A 21-virus zou in het numerieke systeem overeenkomen met enterovirus 24. Het voorstel van de commissie in een overgangsfase, het numerieke systeem tussen haakjes aan de bestaande nomenclatuur toe te voegen, wordt in dit proefschrift gevolgd.

Onderzoekingen van de laatste jaren hebben aangetoond, dat ook bij dieren en planten virussen worden gevonden, die wat structuur en fysisch-chemische eigenschappen betreft, gelijken op enterovirussen van de mens. Ook rhinovirussen, die verkoudheid bij de mens kunnen veroorzaken en vrijwel uitsluitend in de bovenste luchtwegen worden aangetroffen, blijken in verschillende opzichten te gelijken op enterovirussen. In verband hiermee en in verband met het algemene streven virussen te karakteriseren en te klassificeren op grond van de structuur en de fysisch-chemische eigenschappen is de behoefte ontstaan al deze virussen in één hoofdgroep te plaatsen. Op het 8ste Internationale Mikrobiologen Congres te Montreal (International Subcommittee on Virus nomenclature, 1963) werd besloten aan deze hoofdgroep de overkoepelende naam picornavirussen te geven, een samenstelling van „pico” (klein) en RNA (ribonucleïnezuur). Tot de hoofdgroep worden dus de „RNA”-virussen gerekend met een diameter van 15-30 m $\mu$ , die door ether niet geïnactiveerd worden, ongeacht de species, waarin ze worden



aangetroffen en ongeacht de lokalisatie in de gastheer. De hoofdgroep omvat:

A. Picornavirussen, die bij mensen voorkomen

1. Enterovirussen

- a. Poliomyelitisvirussen
- b. Coxsackie-virussen groep A
- c. Coxsackie-virussen groep B
- d. ECHO-virussen

2. Rhino- of ERC (ECHO 28-virus, Rhinovirus, Coryzavirus)-virussen

3. Niet geklassificeerde virussen

B. Picornavirussen, die bij dieren voorkomen, o.a. het mond- en klauwzeervirus, „Teschen disease” virus en waarschijnlijk het encephalomyocarditisvirus (Andrewes e.m., 1961)

C. Picornavirussen, die bij planten voorkomen

### 1.3. Coxsackie-virussen

1.3.1. *Biologische eigenschappen.* Sinds Dalldorf en medewerkers (1948) een filtreerbaar agens uit de feces van 2 patiënten met verlamningsverschijnselen hebben geïsoleerd, zijn een groot aantal virussen, die overeenkomstige kenmerken tonen, in de groep Coxsackie-virussen samengebracht. De groep omvat thans 29 typen, die immunologisch van elkaar verschillen.

De eigenschap, waardoor deze groep wordt gekenmerkt, is de uitzonderlijke pathogeniteit voor pasgeboren muizen bij intraperitoneale en/of intracerebrale inspuiting. Enkele dagen na de infectie treden specifieke verlamningsverschijnselen op, waaraan de dieren binnen korte tijd ten gronde gaan. De gevoeligheid van de muizen verdwijnt reeds enkele dagen na de geboorte. Infectie van jonge muizen van 10-12 dagen en volwassen muizen kan gepaard gaan met laesies in bepaalde organen, doch verloopt in de regel niet dodelijk (Dalldorf, 1957).

Al naar de aard van de afwijkingen, die na de infectie bij de pasgeboren muizen optreden, kunnen Coxsackie-virussen in 2 groepen worden verdeeld: groep A, waarin 23 typen zijn ondergebracht (enterovirus 4-26), en groep B, waarin 6 typen zijn te onderscheiden (enterovirus 27-32).

Pasgeboren muizen, die met Coxsackie A-virus zijn geïnfecteerd, tonen na 3-5 dagen een paralyse, die binnen enkele dagen tot de dood

leidt. De laesies beperken zich tot de dwarsgestreepte spieren. Ze tonen een gegeneraliseerde en uitgebreide myositis.

Infektie met Cocksackie B-virussen geeft aanleiding tot tremoren en verlammingen, die spastisch van aard zijn. De laesies beperken zich niet tot de spieren, waarin slechts zeer lokaal myositis is waar te nemen, doch komen ook in andere orgaansystemen voor. Karakteristiek is de degeneratie van het bruine vet en het interscapulaire vetkussen. Bij oudere muizen, waarbij de infektie minder snel tot de dood leidt, kunnen ook andere organen afwijkingen tonen. Men heeft hersenverwekingen, hepatitis, myocarditis (Grodums e.m., 1962) en necrose van de acini van de pancreas (Pappenheimer e.m., 1951) waargenomen.

Aanvankelijk werd voor de isolatie van Cocksackie-virussen hoofdzakelijk gebruik gemaakt van pasgeboren muizen. Het toenemende gebruik van weefselkweken bij het virusonderzoek heeft aangetoond, dat een groot aantal virussen uit deze groep te kweken zijn in weefselkweken (Melnick, 1958; Lenahan e.m., 1961). In weefselkweken gaat de virusvermenigvuldiging gepaard met een cytopathologisch effect, dat zich niet onderscheidt van het effect van andere enterovirussen. In het ongekleurde, natte preparaat van weefselkweken, die met enterovirussen zijn beënt, worden cellen waargenomen, die zich afronden en ten gevolge hiervan het licht sterker breken, vervolgens schrompelen, pyknotisch worden en van de glaswand los laten.

Alle Cocksackie-virussen met uitzondering van Cocksackie A 19-virus (enterovirus 22) kunnen zich vermenigvuldigen in weefselkweken. Een overzicht van een aantal onderzoeken betreffende de virusvermenigvuldiging is in Tabel 1 weergegeven.

Het overzicht in Tabel 1 mag niet worden opgevat als een groepering van Cocksackie-virussen naar weefselaffiniteit, daar een aantal typen niet vergelijkend zijn onderzocht. De meeste Cocksackie-virussen kunnen zich vermenigvuldigen in celkweken van primaten, in de regel afkomstig van de mens. Slechts Cocksackie A 1-, A 4- en A 22-virus (enterovirus 4, 7 en 25) zijn alleen te kweken in cellen van muizenembryo's, die 9 tot 15 dagen oud waren (Moore e.m., 1964). Alle Cocksackie B- en een aantal Cocksackie A-virustypen kunnen zich zowel in celkweken van primaten als in celkweken van muizenembryo's vermenigvuldigen.

1.3.2. *Antigene eigenschappen.* De 29 typen van de Cocksackie-virusgroep kunnen in 2 groepen worden verdeeld: 23 typen in de Cocksackie A groep en 6 typen in de Cocksackie B groep. De antigenen

Tabel 1. *Vermenigvuldiging van Cocksackie-virussen in weefselkweken*

Virus	Type, dat zich vermenigvuldigt in weefselkweken van		Onderzoekers
	Primates	Niet-primates	
Coxs. A	6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 21, 23, 24		<div> Sickles e.m., 1955 en 1959  Lehman-Grube e.m., 1959  Dunnebacke e.m., 1960  Lenahan e.m., 1961 </div>
Coxs. A		1, 4, 22	<div> Slater e.m., 1950  Moore e.m., 1964 </div>
Coxs. A	2, 3, 5, 9, 13, 16, 18, 20	2, 3, 5, 9, 13, 16, 18, 20	<div> Shaw, 1952  Wenner, 1962  Moore e.m., 1964 </div>
Coxs. B	1 - 6	1 - 6	

eigenschappen van de Cocksackie A-virussen zijn zowel bij dieren als bij mensen bestudeerd. Bij immunisatie van muizen (Contreras e.m., 1952; Sickles e.m., 1959; Munch, 1962) werd waargenomen, dat neutraliserende en komplementbindende antistoffen tegen de verschillende typen zeer specifiek waren. Slechts tussen enkele typen zijn duidelijk kruisreacties aangetoond, namelijk tussen A 3 en A 8 (enterovirus 6 en 11), tussen A 11 en A 15 (enterovirus 14 en 18) en tussen A 13 en A 18 (enterovirus 16 en 21) (Sickles e.m., 1959; Munch, 1962). Bij de bereiding van gestandaardiseerde antisera tegen 23 typen van Cocksackie A-virussen bij apen zijn bovengenoemde kruisreacties in de neutralisatiereactie eveneens waargenomen (Kamitsuka e.m., 1965). Een aantal kruisreacties tussen andere typen zijn waargenomen, doch niet steeds bevestigd. Voor een overzicht hiervan wordt verwezen naar het artikel van Kamitsuka en medewerkers (1965). De komplementbindingsreactie met antisera, die bij apen waren bereid, gaf uitgebreide kruisreacties te zien, die door gastheercomponenten van het virusantigeen waren veroorzaakt, zodat hiermee geen onderzoek van antigene eigenschappen kon worden verricht.

Bij mensen, die met een bepaald type Cocksackie-virus zijn geïnfecteerd, is herhaaldelijk ontwikkeling van antistoffen tegen andere typen Cocksackie-virussen waargenomen (= heterotypische reacties). Sommige onderzoekers (Beeman e.m., 1952; Kraft e.m., 1952) hebben uitgebreide heterotypische reacties aangetoond door middel van de komplement-bindingsreactie. Er werd bij deze onderzoeken geen toeneming van heterotypische neutraliserende antistoffen waargenomen. Neutraliserende antistoffen waren in de regel reeds aanwezig aan het begin van de infectie; de heterotypische komplementbindingsreacties berusten dus waarschijnlijk op een anamnestiche reactie ten opzichte van een vroegere infectie met een type, dat antigeen verwant is aan het type, dat later een infectie veroorzaakte.

Er zijn met de komplementbindingsreactie ook heterologe reacties gevonden tussen typen van verschillende groepen van de enterovirussen (Goetz, 1958; Hammon e.m., 1958; Johnsson e.m., 1958; Neva e.m., 1959). De waarnemingen van verschillende onderzoekers lopen nogal uiteen, daar op verschillende wijze geselecteerde patiënten zijn onderzocht met antigenen, die op verschillende wijzen zijn bereid. Lennette en medewerkers (1961) onderzochten sera van 379 patiënten, die waren geïnfecteerd met Cocksackie A-, Cocksackie B- of ECHO-virus, op de ontwikkeling van komplementbindende antistoffen tegen de 3 typen poliomyelitisvirus. Zij hebben de reacties verricht met virus, dat in HeLa-cellen was bereid en niet werd gezuiverd of verhit. Bij patiënten met infectie door Cocksackie-virus werd in 3-4% van de 316 gevallen en bij patiënten met infectie door ECHO-virus in 16% van 63 gevallen ontwikkeling van antistoffen tegen poliomyelitisvirus aangetroffen. Het hogere percentage bij patiënten met infectie door ECHO-virus, werd in hoofdzaak veroorzaakt door infecties met ECHO 9-virus.

Mietens en medewerkers (1964) hebben een kleine groep caviae geïmmuniseerd door achtereenvolgens zes verschillende typen van de enterovirusgroep intramuskulair in te spuiten. Na elke inspuiting werd met de komplementbindingsreactie onderzoek op antistoffen verricht. Zij vonden, dat heterotypische reacties tussen typen van de poliomyelitisvirusgroep (type 1 en type 2) bij 60% en tussen typen van de Cocksackie B-virusgroep (B 1 en B 5) bij 90% der onderzochte dieren voorkwamen, terwijl heterologe reacties tussen typen uit verschillende groepen slechts bij 10% werden waargenomen.

Heterotypische antistoffen zijn ook met de neutralisatiereactie aangetoond (Johnson e.m., 1960; Lennette e.m., 1961). In het onderzoek van Johnson en medewerkers werden 77 patiënten onderzocht, bij wie

infekties met poliomyelitisvirus type 1, ECHO 9-, Coxsackie A 9-, Coxsackie B 2-, Coxsackie B 5- en ECHO 15-virus waren vastgesteld. In 19% van de gevallen werd een duidelijke ontwikkeling van neutraliserende antistoffen tegen een ander type gevonden. Ontwikkeling van antistoffen tegen heterologe typen uit dezelfde groep werd waargenomen bij 16% van 37 patiënten met infectie door poliomyelitisvirus en bij één van 4 patiënten met infectie door Coxsackie B-virus. Bij 4 van 7 patiënten met Coxsackie A 9-virusinfectie werd antistofontwikkeling tegen poliomyelitisvirus waargenomen, één maal tegen type 1, dat in die periode cirkuleerde, en 3 maal tegen type 2 en 3.

Bij een onderzoek van 238 patiënten met infecties door Coxsackie B 2-, B 3-, B 4- en B 5-virus (Lennette e.m., 1961) werd in 10% van de gevallen ontwikkeling van neutraliserende antistoffen tegen een ander type Coxsackie-virus dan het geïsoleerde type vastgesteld.

Uit onderzoekingen met behulp van de neutralisatiereactie blijkt dus, dat een aantal typen Coxsackie-virussen antigene eigenschappen met elkaar gemeen hebben (Sickles e.m., 1959; Lennette e.m., 1961; Munch, 1962; Kamitsuka e.m., 1965). Verder bestaat er waarschijnlijk antigene verwantschap tussen Coxsackie A 9-virus en poliomyelitisvirus (Johnson e.m., 1960).

De uitgebreide heterotypische reacties tussen verschillende typen Coxsackie-virussen, die door middel van de komplementbindingsreactie zijn aangetoond bij patiënten (Beeman e.m., 1952; Kraft e.m., 1952) en in sera van geïmmuniseerde caviae (Mietens e.m., 1964), wijzen mogelijk op de aanwezigheid van een groepsantigeen. De onderzoekingen bij patiënten met behulp van de komplementbindingsreactie (Goetz, 1958; Hammon e.m., 1958; Johnsson e.m., 1958; Neva e.m., 1959) laten nog geen konklusies toe omtrent de uitgebreidheid van antigene verwantschap tussen typen uit verschillende enterovirusgroepen, daar de uitkomsten sterk afhankelijk zijn van het aantal en de soort infecties, die in het verleden zijn doorgemaakt.

#### 1.4. Coxsackie A 21-virus (enterovirus 24)

1.4.1. *Enkele eigenschappen van Coxsackie A 21-virus.* Reeds voordat het bekend was, dat „Coe”-virus identiek was aan Coxsackie A 21-virus, had men gevonden, dat biologische en fysisch-chemische eigenschappen van „Coe”-virus overeenkwamen met die van enterovirussen.

De grootte van „Coe”-virus, bepaald door middel van filtratie door Gradocol membranen, lag in de grootte-orde van 20m $\mu$  (Pereira e.m.,

1959). Bij waarnemingen en metingen aan gezuiverde viruspreparaten onder de elektronenmikroscoop werden ronde partikels gevonden, die diameters hadden van 27 m $\mu$  (Frommhagen e.m., 1961) en 39 m $\mu$  (Abraham, 1962). Het verschil in afmetingen berust waarschijnlijk op de verschillende droogmethoden, die werden toegepast ter voorbereiding van het elektronenmikroskopische onderzoek.

Het „Coe”-virus is een relatief stabiel virus. Bij blootstelling aan temperaturen van 4-20° C gedurende 20 dagen blijft de infectiositeit vrijwel onverzwakt. Bij 37° C neemt de infectiositeit in een tijdsverloop van 3 dagen met 90% af. Na verwarming op 50° C gedurende 30 minuten blijven zelfs nog viruspartikels aantoonbaar, hoewel in een geringe hoeveelheid. Bij verhitting op 56° C is het virus na 15 minuten geïnactiveerd (Jordan, 1960; Abraham, 1962).

Het virus blijft in een breed pH gebied intact. Na inkubatie gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur bij een pH van 6,0-9,0 treedt geen verlies op van infectiositeit (Jordan, 1960). Bij de bepaling van de pH stabiliteit van een groot aantal picornavirussen bleek Coxsackie A 21-virus zich gedurende 3-4 uren bij kamertemperatuur bij een pH van 3,0 zonder verlies van infectiositeit te handhaven (Ketler e.m., 1962).

De infectiositeit van „Coe”-virus blijft na behandeling met ether behouden (Pereira e.m., 1959; Jordan, 1960).

Met behulp van een direkte en een indirekte methode is vastgesteld, dat de aard van de kernsubstantie van het virus ribonucleïnezuur (RNA) is. Bij de direkte methode werd gebruik gemaakt van een preparaat, dat in een cesiumchloride gradient was gezuiverd. Door colorimetrisch onderzoek met behulp van orcinol kon worden bepaald, dat 20% van het virus uit RNA bestaat (Frommhagen e.m., 1961). Bij de indirekte methode werd gebruik gemaakt van het verschijnsel, dat sommige cytostatica, zoals 5-bromo- of 5-fluorodesoxyuridine en aminopterie in bepaalde doseringen de produktie van DNA-virussen wel remmen en RNA-virussen niet. De vermenigvuldiging van „Coe”-virus werd niet geremd, zelfs niet na toevoeging van een dosis, die 100 maal zo groot was als de dosis, die nodig is voor remming van DNA-virussen (Abraham, 1962).

Hoewel aanvankelijk niet was waargenomen, dat „Coe”-virus hemagglutinatie kon veroorzaken (Lennette e.m., 1958; Pereira e.m., 1959), bleek dit vermogen wel aanwezig te zijn bij een groot aantal aan „Coe”-virus identieke stammen, die naderhand door Johnson en medewerkers (1961) waren geïsoleerd. Deze onderzoekers vonden, dat 227



van 238 door hen geïsoleerde virusstammen menselijke O-erythrocyten bij 4° C agglutineerden. De stammen waren afgezonderd in verse kweken van niercellen van menselijke foetussen. De oorspronkelijke „Coe”-virusstam toonde, ook in handen van de laatst genoemde onderzoekers, dit verschijnsel niet. Deze divergentie schreven zij toe aan een verlies van het hemagglutinerend vermogen van virusstammen ten gevolge van herhaalde passages in kulturen van cellen (cellijnen), die gedurende lange tijd zijn voortgekweekt. Deze verklaring vindt steun in experimenten, waarbij uit farynxsekreet van een patiënt een virusstam werd geïsoleerd, die herhaalde malen werd gepasseerd in kweken van verse weefsels en in een cellijn (Johnson e.m., 1962). De produktie van hemagglutinen bleef in de verse weefselkweken konstant, terwijl in de cellijn na de zesde passage geen hemagglutinine meer was aan te tonen. Daarentegen was er in de cellijn geen reductie in de vorming van infectieus virus. Johnson en medewerkers veronderstellen, dat er varianten voorkomen van Cocksackie A 21-virus, die respektievelijk wel en niet hemagglutineren. Uit een tweede passage in de cellijn konden zij door adsorptie aan menselijke O-erythrocyten hemagglutinerende partikels selekteren, die in verse kweken van niercellen van menselijke foetussen en in een celstam (WI-26) waren voort te kweken. Het verlies van hemagglutinen bij passage in cellijnen zou een gevolg kunnen zijn van een overwegende produktie van de niet-hemagglutinerende variant bij het kweken van het virus in cellijnen.

Schmidt en medewerkers (1962) hadden de gelegenheid vroege passages van de oorspronkelijke „Coe”-virusstam opnieuw op hemagglutinerend vermogen te onderzoeken. Het bleek nu, dat ook deze stam hemagglutinen vormde. Bij voortgezette passage in cellijnen werd door deze onderzoekers géén verlies van het hemagglutinerend vermogen gevonden. Wel werd er waargenomen, dat de produktie van hemagglutinen van passage tot passage sterk varieerde. Bovendien bleken er verschillen te bestaan tussen verschillende stammen; ongeveer de helft van 16 stammen, die in cellijnen waren geïsoleerd, waren niet in staat hemagglutinaties te veroorzaken. Naar analogie van de bevindingen met polyomavirus, waarvan de hemagglutinen door bestanddelen in weefselkweekvloeistoffen „afgeschermd” kunnen worden en door bepaalde chemische of fysische behandelingen „ontmaskerd” kunnen worden, behandelde de onderzoekers virussuspensies van stammen, die waren gekweekt in cellijnen, met fluorocarbon. Deze behandeling bleek de hemagglutinerende aktiviteit van de meeste positieve stammen te verhogen, terwijl de stammen, die aanvankelijk geen hemagglutinaties toonden, na

behandeling positief werden. Het bleek, dat de remmer ook aanwezig was in vloeistoffen van celkweken, die niet met virus waren beënt. Een nader onderzoek van de eigenschappen van deze remmer (Schmidt e.m., 1964) toonde aan, dat de stof niet was te dialyseren, een Seitz filter niet passeerde en niet geïnactiveerd werd na verhitting gedurende 30 minuten op een temperatuur tussen 60° en 80° C. De gevoeligheid van de remmer voor chymotrypsine en organische oplosmiddelen duidt op een lipoproteïne. De remmer is niet te sedimenteren door centrifugeren op 105.000 g; hierdoor is aangetoond, dat deze remmer verschilt van de remmende activiteit van celbestanddelen.

Hemagglutinatatie van Cocksackie A 21-virus kan in een breed pH-gebied plaats vinden. Tussen pH 5,5 en 7,5 werden geen significante verschillen waargenomen. Boven een pH van 7,5 daalde het hemagglutinerend vermogen sterk (Johnson e.m., 1962; Schmidt e.m., 1962). Optimale hemagglutinatatie zou plaats vinden tussen pH 5,8 en 6,8 (Schmidt e.m., 1962).

De optimale temperatuur, waarbij hemagglutinatatie plaats vindt is 4° C. Bij kamertemperatuur liggen de titers 4 tot 8 maal lager en bij 34° C blijft hemagglutinatatie uit (Johnson e.m., 1961).

Erythrocyten van kippen, caviae en schapen blijken in tegenstelling tot menselijke O-erythrocyten niet door Cocksackie A 21-virus te worden geagglutineerd (Lennette e.m., 1958; Pereira e.m., 1959).

De hemagglutinatatie veroorzaakt geen enzymatische destructie van de receptoren van de erythrocyten. Na elutie van aan erythrocyten geadsorbeerd virus kunnen de erythrocyten opnieuw door vers virus worden geagglutineerd (Johnson e.m., 1961).

In 1959 (Sickles e.m., 1959) werden 5 nieuwe typen aan de Cocksackie A-virusgroep toegevoegd. De nieuwe typen werden geklassificeerd als A 20, 21, 22, 23 en 24. In feite zijn het echter 4 nieuwe typen, daar naderhand bleek, dat type 23 identiek was met het reeds eerder geklassificeerde ECHO 9-virus (enterovirus 40). Als prototype-stam van Cocksackie A 21-virus werd de stam „Kuykendall” gekozen, die evenals de „Coe”-virusstam in het laboratorium van Lennette was geïsoleerd. De stam „Kuykendall” werd naast poliomyelitisvirus type 1 uit een monster feces van een patiënt met verlamingsverschijnselen geïsoleerd. De isolatie is tot stand gekomen in een kweek van huid- en spierweefsel van een foetus. Nadat het virus 4 maal in dit weefsel was gepaseerd, werd vloeistof van de beënte weefselkweek intraperitoneaal bij pasgeboren muizen ingespoten. De muizen toonden slechts geringe ziekteverschijnselen. Het hersenweefsel en het spierweefsel van de zieke

muizen werden afzonderlijk opnieuw in pasgeboren muizen gepasseerd. Passage van het hersenweefsel gaf een negatief resultaat. Passage van het spierweefsel veroorzaakte echter een progressie in de morbiditeit en was voor sommige muizen dodelijk (Schmidt e.m., 1961). Het optreden van verlamningsverschijnselen in pasgeboren muizen kort na infectie, de uitgesproken myositis en het ontbreken van laesies in het hersenweefsel waren de criteria, op grond waarvan de stam „Kuykendall” in de Cocksackie A-virusgroep werd ondergebracht (Sickles e.m., 1959).

Van de „Coe”-virusstam (Lennette e.m., 1958) en van een tweetal andere hieraan identieke stammen (Pereira e.m., 1959; van der Veen e.m., 1960) werd eveneens de pathogeniteit voor pasgeboren muizen bepaald. De geringe morbiditeit van muizen, die voor de eerste maal met vloeistof van een met virus beënte weefselkweek waren geïnfecteerd, is ook in deze proeven waargenomen. In tegenstelling met het onderzoek van Schmidt en medewerkers (1961) resulteerde passage van het spierweefsel in een afneming van de ziekteverschijnselen.

Underwood en medewerkers (1962) merkten op, dat adaptatie van „Coe”-virus aan muizen afhankelijk is van de gevoeligheid van de muizenstam. Gebruikten zij voor de beginpassages een bepaalde stam van witte „Swiss” muizen, dan kwam de adaptatie niet tot stand; de morbiditeit was gering en nam af bij verdere passages. Werd in de beginfase van de aanpassing de zgn. „Tan” muizenstam, een willekeurige kruising tussen een witte „Swiss” Webster en een bruine C-57 muizenstam, gebruikt, dan traden vanaf de derde passage de typische verschijnselen op, waarbij een hoog virusgehalte in het spierweefsel werd aangetroffen. Na de 9de passage in de „Tan” muizenstam was het virus zo goed aan muizen aangepast, dat het ziekteverschijnselen veroorzaakte na toediening aan de weinig gevoelige witte „Swiss” muizen, ook wanneer het virus verder in „Swiss” muizen werd gepasseerd. Door geleidelijke aanpassing aan steeds wat oudere muizen gelukte het bij 21-24 dagen oude muizen typische verlamningsverschijnselen op te wekken met een mortaliteit van 80-100%. Het virus was zelfs aan 12 gram zware witte „Swiss” muizen aan te passen; bij passage van het virus in deze dieren werden steeds ziekteverschijnselen waargenomen. Door Sickles en medewerkers (1959) was eerder beschreven, dat de pathogeniteit van Cocksackie A 21-virus voor muizen van 10-12 gram wisselde in verschillende proeven.

Het aan muizen geadapteerde virus was niet veranderd in pathogeniteit voor weefselkweken en in antigene eigenschappen. De geadap-

teerde en de oorspronkelijke stam werden in gelijke mate door antiserum tegen „Coe”-virus geneutraliseerd.

Intranasale besmetting van muizen met geadapted virus gaf geen aanleiding tot ziekteverschijnselen. De muizen waren echter 2 weken na de besmetting beschermd tegen intracerebrale toediening van virus.

Isolatie van Cocksackie A-virussen geschiedt bij voorkeur in pasgeboren muizen. Het valt echter op, dat alle tot nu toe beschreven Cocksackie A 21-virusstammen in weefselkweken zijn geïsoleerd en dat de pathogeniteit van deze stammen voor pasgeboren muizen slechts met moeite is aangetoond. Het virus kan het beste worden gekweekt in weefsels van menselijke herkomst. Kweken van o.a. vers schildklierweefsel (van der Veen e.m., 1960) en vers foetaal nierweefsel (Johnson e.m., 1962), celstammen, die gedurende beperkte tijd worden aangehouden, o.a. kweken van foetale longcellen (WI-26), en cellijnen, die jarenlang zijn voortgekweekt, o.a. HeLa-, KB- en HEp-cellen en cellijnen van amnion, uterus, neusslijmvlies en reticulosarcoom van de long (T<sub>4</sub>) (Lennette e.m., 1958; Pereira e.m., 1959; Sickles e.m., 1959; Jordan, 1960; van der Veen e.m., 1960; Lenahan e.m., 1961; Mufson e.m., 1962; Underwood e.m., 1962) zijn hiervoor gebruikt. In kweken van verse apeniercellen werd geen cytopathologisch effect waargenomen. Er kan in deze cellen echter wel vermenigvuldiging optreden. Aan Johnson en medewerkers (1962) is het gelukt hierin Cocksackie A 21-virus te isoleren. De ruime keuze van menselijke cellen heeft weinig behoefte doen ontstaan cellen van niet-primaten voor virusproductie in te schakelen. Het virus veroorzaakt geen cytopathologisch effect in kweken van verse kippeweefsels (Sickles e.m., 1959).

Het optreden van waarneembare cytopathologische effecten blijkt geen maatstaf te zijn voor de mate van virusvermenigvuldiging. Uit kweken van HeLa-cellen, waarin slechts 50% van de cellen cytopathologische veranderingen toonden, werd toch een redelijke virusopbrengst verkregen (Lennette e.m., 1958). Wanneer beënte kulturen in een draaiende trommel in plaats van stationair werden geïnkubeerd, breidde het cytopathologische effect zich over een groter aantal cellen uit. De virusproductie was in beide gevallen echter gelijk. Wel werd er in kulturen, die werden gedraaid, eerder virus gevormd. Een verklaring voor dit verschijnsel is niet gegeven (Mufson e.m., 1962).

Cocksackie A 21-virus vermenigvuldigt zich niet in bebroede kippeieren (Lennette e.m., 1958; Pereira e.m., 1959).

#### 1.4.2. *Pathogeniteit voor de mens.* Een infectie met Cocksackie

A 21-virus kan bij de mens subklinisch verlopen. Er zijn echter ook verschillende mededelingen gedaan over isolaties van dit virus bij patiënten. In Tabel 2 wordt een overzicht gegeven van symptomen, die bij hen zijn waargenomen.

Tabel 2. *Verschijselen bij patiënten met infecties door Coxsackie A 21-virus*

Onderzoekers:	Coryza	Faryngitis Keelpijn	Hoesten Heesheid	Pneumonie	Temp. C	Hoofdpijn Spierpijn Alg. malaise	Adenitis	Conjunctivitis
Lennette e.m. (1958)	+	+						
Pereira e.m. (1959)	+	+	+		≤ 37,6°	+	+	+
van der Veen e.m. (1960)		+	+		≤ 38,5°			
Fukumi e.m. (1961)	+	+	+		≤ 38,0°			
Johnson e.m. (1962)	+	+	+		≤ 38,8°	+		
Kjersgaard e.m. (1962)	+	+	+		38,0°	+		
McDonald e.m. (1962)	+	+	+	+	> 37,8°	+		+

Het blijkt, dat de afwijkingen hoofdzakelijk gelokaliseerd zijn in de nasofarynx. Slechts in één geval werd pneumonie waargenomen (McDonald e.m., 1962). Infectie van de bovenste luchtwegen kan gepaard gaan met algemene verschijnselen, zoals ziektegevoel, hoofdpijn en spierpijn. De temperatuursverhoging duurt slechts enkele dagen en is in de regel gering. Adenitis en conjunctivitis worden sporadisch waargenomen. Gastro-intestinale verschijnselen staan niet op de voorgrond.

Bij proeven op volwassen vrijwilligers, die met een kleine hoeveelheid virus via de neus werden besmet, werd een inkubatietijd van 2-4 dagen gevonden. De eerste verschijnselen konden reeds 36 uren na de besmetting worden waargenomen. Ziekte trad op bij 90-100% van de

proefpersonen, die met virus waren besmet. Bij proefpersonen, die op dezelfde wijze met kontrolemateriaal waren behandeld, trad geen ziekte op. De ziekteverschijnselen waren die van een „common cold”. De proefpersonen klaagden over neusverkoudheid, keelpijn, hoofdpijn, spierpijn en algemeen ziektegevoel. Er werden bij hen verschijnselen van coryza waargenomen. In ongeveer de helft van de gevallen was temperatuursverhoging waar te nemen, die echter de 38,0° C niet overschreed. De verschijnselen verdwenen in 2-3 dagen (Parsons e.m., 1960; Patel e.m., 1960).

Spickard en medewerkers (1963) hebben een groep van 35 vrijwilligers met Cocksackie A 21-virus besmet. Zij zagen, dat het ziektebeeld afhankelijk was van de antistoftiter. Indien het gehalte aan antistoffen in het bloed op het moment van de besmetting hoog was, werden de proefpersonen niet ziek. Ziekteverschijnselen werden in ongeveer 60-65% van de gevallen waargenomen bij proefpersonen, die weinig of geen antistoffen hadden tijdens de toediening van het virus. Bij proefpersonen, die een laag gehalte aan antistoffen in het bloed hadden, waren de verschijnselen beperkt tot neusverkoudheid. De proefpersonen, die op het moment van de besmetting geen antistoffen hadden, toonden meer algemene klachten, zoals spierpijn, hoofdpijn en ziektegevoel. Bij 6 van de 8 gevallen uit deze laatste groep was de temperatuur verhoogd.

De toediening van een grote hoeveelheid virus via de neus aan proefpersonen, die geen antistoffen hadden, gaf aanleiding tot een wat ernstiger ziektebeeld (Spickard e.m., 1963). De algemene verschijnselen waren ernstiger en langduriger. Hoofdpijn en spierpijn, die vooral waren gelokaliseerd in het gebied van de nek en de rug, hielden 8 dagen na de besmetting aan. Op de tweede en derde ziektedag verscheen er een maculair exantheem op borst, armen en gelaat. De koorts steeg tot 40,6° C en daalde geleidelijk in de loop van 5 dagen. Bij het lichamelijke onderzoek werden één maal rhonchi gehoord. Er waren geen neurologische afwijkingen. In het bloed en in de liquor werden geen afwijkingen gevonden.

Na de besmetting per os met een grote hoeveelheid virus traden geen ziekteverschijnselen op. Het virus kon uit de feces worden afgezonderd, doch er konden enkele weken na de besmetting geen neutraliserende antistoffen worden aangetoond (Spickard e.m., 1963).

Het virus kan na een besmetting via de neus steeds uit keelsekreet worden afgezonderd. Ook lang nadat de ziekteverschijnselen zijn verdwenen, blijft het virus in neus- en keelsekreet aantoonbaar. Spickard en medewerkers (1963) vonden bij proefpersonen, die op het moment



van de besmetting geen antistoffen hadden, een gemiddelde uitscheidingsduur in de keel van 16,5 dag. De proefpersonen, die reeds antistoffen hadden, scheidden het virus gemiddeld 5 dagen uit. Het virus kon ook in feces worden aangetoond, doch minder vaak dan in keelsekreet. Uit 24-30% van de onderzochte monsters feces, die in de eerste week na de besmetting waren verzameld, kon virus worden afgezonderd, terwijl ongeveer 80% van de monsters keelsekreet uit dezelfde periode en van dezelfde personen virus bevatte (Parsons e.m., 1960; Spickard e.m., 1963). In de tweede week was het virus bijna even vaak in keelsekreet als in feces aanwezig, respectievelijk in 58% en 46% van de onderzochte monsters. Na besmetting via de neus of mond kon het virus niet uit bloed of liquor worden afgezonderd (Spickard e.m., 1963; Patel e.m., 1964).

Er werden na een kunstmatige besmetting niet altijd aantoonbare neutraliserende antistoffen gevormd. Parsons en medewerkers (1960) konden slechts bij 2 van 9 proefpersonen, die allen ziek werden en het virus in de keel uitscheidden, een duidelijke ontwikkeling van neutraliserende antistoffen aantonen. Zij hebben bloed onderzocht, dat vlak vóór en ongeveer 12 dagen na de besmetting was afgenomen. Patel en medewerkers (1964) hebben bij proefpersonen, die geen antistoffen hadden vóór de besmetting, op de 8e dag na de besmetting geen antistoffen gevonden. Op de 30e dag hadden zich echter bij 6 van 10 geïnfecteerde personen neutraliserende antistoffen ontwikkeld. Spickard en medewerkers (1963) vonden bij proefpersonen, die geen antistoffen hadden op het moment van de besmetting, een geleidelijke ontwikkeling van neutraliserende en hemagglutinatieremmende antistoffen. Op de veertiende dag waren voor het eerst antistoffen aantoonbaar. De antistoftiter steeg tot ongeveer de 22e dag. Proefpersonen, die weinig antistoffen hadden, toonden in de tweede week een abrupte stijging van de antistoftiter, die op de 14e dag maximaal was. Bij een hoog antistofgehalte in het bloed werd geen verdere toeneming gezien.

Uit deze waarnemingen blijkt, dat de ontwikkeling van antistoffen bij personen, die voor de eerste maal met Coxsackie A 21-virus zijn geïnfecteerd, traag verloopt en vaak pas na 14 dagen duidelijk is aan te tonen. Verder blijkt het, dat personen, die antistoffen in het bloed bezitten, toch kunnen worden geïnfecteerd door toediening van virus; de infecties verlopen in de regel zonder of met geringe ziekteverschijnselen.

1.4.3. *Epidemiologische gegevens.* Op grond van de aanwezigheid van neutraliserende antistoffen in het bloed van de normale bevolking

kan men zich een beeld vormen van de cirkulatie van Cocksackie A 21-virus. In Tabel 3 worden de uitkomsten van enkele onderzoeken weer-gegeven.

Tabel 3. *Neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus bij personen uit de normale bevolking*

Onderzoekers	Leeftijdsgroep in jaren							
	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	
	m. vr.	m. vr.	m. vr.	m. vr.	m. vr.	m. vr.	m. vr.	
Pereira e.m. (1959)	0 <sup>1</sup> ) 2	20 11	41 7	50 12	40 25	62 60	71 52	
Fukumi e.m. (1961)	1,9-3,1	16 27					54	
Abraham (1962)			5,2	12,1				

<sup>1</sup>) Percentage positieve sera.

Uit Tabel 3 blijkt, dat de aanwezigheid van neutraliserende antistoffen met de leeftijd toeneemt. Het valt op, dat bij kinderen betrekkelijk zelden antistoffen worden aangetroffen. Er is in de toeneming van antistoffen op oudere leeftijd een divergentie waar te nemen tussen mannen en vrouwen. In tegenstelling met de bevindingen bij vrouwen blijkt het percentage positieve sera van mannen scherp te stijgen in het leeftijdstrajekt van 11 tot 30 jaar. Op oudere leeftijd neemt dit verschil af. Pereira en medewerkers (1959) hebben de suggestie geopperd, dat de divergentie een gevolg zou kunnen zijn van de militaire dienstdienst, waarin een grotere kans op infectie met dit agens zou bestaan. Fukumi en medewerkers (1961) vergeleken militairen, die enkele maanden tevoren onder de wapenen waren geroepen, met militairen, die eerder waren opgeroepen en gedurende de winter in dienst waren geweest. Zij vonden, dat het percentage personen met neutraliserende antistoffen in de laatste groep aanzienlijk hoger lag dan in de eerste groep. De cijfers waren respectievelijk 44% en 9,5%. Abraham (1962), die verschillende bevolkingsgroepen in Pittsburg heeft onderzocht, trof slechts in een klein percentage der gevallen antistoffen aan. Aangezien gegevens over het onderzochte materiaal ontbreken, is het niet geoorloofd zijn bevindingen met die van andere onderzoekers te vergelijken.

De epidemiologie is het beste bestudeerd bij militairen. Naar aanleiding van de isolatie van „Coe”-virus bij militairen met luchtweg-infecties hebben Lennette en medewerkers (1958) bij andere patiënten uit hetzelfde militaire kamp serologisch onderzoek op Cocksackie A 21-virus verricht. Bij 5 van 23 onderzochte militairen, die leden aan een respiratoire aandoening, waarvan de etiologie onbekend was, was het serologische onderzoek positief.

De bevindingen van Lennette en medewerkers en van andere onderzoekers (Pereira e.m., 1959; van der Veen e.m., 1960; Fukumi e.m., 1961) wezen op een etiologisch verband tussen Cocksackie A 21-virus en akute respiratoire aandoeningen. Deze veronderstelling werd bevestigd door het onderzoek van Johnson en medewerkers (1962) en van Bloom en medewerkers (1962). Johnson en medewerkers (1962) hebben in de periode van medio september tot en met november 1960 een groot aantal Cocksackie A 21-virusstammen geïsoleerd bij rekruten. Ze hebben 230 patiënten met akute respiratoire aandoeningen en 259 gezonde controle-personen onderzocht. Bij 116 patiënten (50%) en 98 controle-personen (38%) werd virus geïsoleerd. Het verschil was statistisch significant. Nadere analyse van de gegevens toonde aan, dat in de eerste weken van het onderzoek het verschil in isolaties tussen patiënten en controle-personen duidelijk was, terwijl in de laatste 4 weken het verschil was verdwenen. Er was echter in een ander opzicht verschil tussen de patiënten en controle-personen, bij wie virus was geïsoleerd. Bij de patiënten werd in een beduidend minder aantal gevallen hemagglutinatieremmende antistoffen in het bloed gevonden bij het begin van de infectie dan bij de controle-personen met subklinische infecties; de percentages waren respectievelijk 41% en 69%. Het virus had in de periode van het onderzoek intensief gecirkuleerd. Serologisch onderzoek toonde aan, dat in de periode van juli tot december 1960 ongeveer 76% van de militairen tijdens de oefenperiode van 12 weken was geïnfecteerd, in de periode van november tot maart 1961 ongeveer 18%. Vanaf januari 1961 werden er echter geen serologisch aantoonbare infecties meer aangetroffen.

In dezelfde periode (najaar 1960) werd een soortgelijk onderzoek verricht bij geoefende militairen in een ander kamp (Bloom e.m., 1962). De morbiditeit was aanzienlijk geringer. Ook bij hen werd, evenals bij rekruten, een verband gevonden tussen infectie met Cocksackie A 21-virus en ziekte van de luchtwegen.

Van november 1958 tot april 1959 werden in Engeland infecties met Cocksackie A 21-virus waargenomen bij rekruten van de Royal Air

Force (McDonald e.m., 1962). In november en december werden bij patiënten, die met aandoeningen van de luchtwegen werden opgenomen, vrijwel alleen infecties met Cocksackie A 21-virus vastgesteld. Vanaf januari 1959 werden de luchtweginfecties hoofdzakelijk veroorzaakt door adenovirus en influenzavirussen. Tijdens de gehele studie werd bij 9% van 1197 patiënten door middel van serologisch onderzoek een infectie met Cocksackie A 21-virus vastgesteld; uit 4% van 1129 onderzochte monsters keelsekreet werd het virus afgezonderd. De percentages voor de eerste 2 maanden waren respectievelijk 19% (van 268 patiënten) en 8% (van 400 monsters keelsekreet). Zes honderd vijf en zestig patiënten werden zowel virologisch als serologisch onderzocht. Het bleek, dat slechts 10% van 30 virologisch positieve patiënten en 3% van 80 serologisch positieve patiënten neutraliserende antistoffen hadden aan het begin van de infectie. Bij patiënten, die niet met Cocksackie A 21-virus waren geïnfecteerd, was het percentage ongeveer 30%. Deze bevinding komt overeen met de waarneming van Johnson en medewerkers (1962). Beide onderzoeken suggereren, dat personen, bij wie aan het begin van de infectie antistoffen worden aangetroffen, niet volledig beschermd zijn tegen infectie, echter wel tegen de ontwikkeling van ziekte ten gevolge van infectie. Deze veronderstelling werd bevestigd door de reeds eerder vermelde proeven op vrijwilligers (Spickard e.m., 1963), die niet ziek werden, wanneer op het moment van de besmetting een hoog gehalte aan antistoffen was aangetroffen. Parsons en medewerkers (1960) zagen echter, dat ziekteverschijnselen konden optreden, ondanks de aanwezigheid van een hoog gehalte aan neutraliserende antistoffen. Het is mogelijk, dat de afwijkende uitkomsten van dit laatste onderzoek zijn toe te schrijven aan een verschil in de wijze van toediening van virus.

McDonald en medewerkers (1962) hebben een indruk kunnen krijgen van de duur van uitscheiding van het virus in de keel. Bij 32% van 59 serologisch positieve patiënten werd virus afgezonderd uit een monster keelsekreet, dat in de eerste 3 dagen van de ziekte was afgenomen. Uit keelsekreet, dat na de vierde dag was afgenomen, werd slechts in één van de 20 gevallen virus geïsoleerd. Het virus is dus bij een natuurlijke infectie slechts gedurende korte tijd in de keel aan te tonen. In tegenstelling hiermee werd bij vrijwilligers, die door een kunstmatige besmetting waren geïnfecteerd, virus gedurende gemiddeld 16-17 dagen in de keel aangetroffen (Spickard e.m., 1963).

Serologische onderzoeken, die enige tijd later bij rekruten van de Royal Air Force werden verricht (McDonald e.m., 1962), gaven

een indruk van de morbiditeit ten gevolge van infecties met Cocksackie A 21-virus. In de eerste 3 maanden van 1960 werd van 205 rekruten bloed afgenomen direct na opkomst in dienst en 3 maanden later. Er werden zowel titerstijgingen van antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus als van antistoffen tegen adenovirus gevonden. Klaarblijkelijk cirkuleerden beide virussen onder de militairen. De onderzoekers hebben op grond van de uitkomsten van de serologische onderzoeken de morbiditeit ten gevolge van infecties met Cocksackie A 21-virus geschat op 12% en die ten gevolge van infecties met adenovirus op 34%.

De morbiditeit ten gevolge van infecties met Cocksackie A 21-virus is in het algemeen slechts laag vergeleken met de morbiditeit ten gevolge van andere akute respiratoire aandoeningen. Verspreiding van Cocksackie A 21-virus onder de algemene bevolking is dientengevolge in de regel niet waarneembaar aan een duidelijke stijging van het aantal ziektegevallen (Johnson e.m., 1962; Kjersgaard e.m., 1962; McDonald e.m., 1962).

Uit onderzoeken bij militairen is gebleken, dat Cocksackie A 21-virus in gesloten gemeenschappen in bepaalde perioden intensief kan cirkuleren (Johnson e.m., 1962). De intensiteit van de cirkulatie was het sterkste in het najaar (Johnson e.m., 1962; McDonald e.m., 1962).

De epidemiologische onderzoeken van Johnson en medewerkers (1962) en van McDonald en medewerkers (1962), en de proeven op vrijwilligers (Parsons e.m., 1960; Spickard e.m., 1963; Patel e.m., 1964) hebben aangetoond, dat er een etiologisch verband bestaat tussen akute respiratoire aandoeningen en Cocksackie A 21-virus. Deze bevinding wordt ondersteund door waarnemingen in andere landen (van der Veen e.m., 1960; Fukumi e.m., 1961; Kjersgaard e.m., 1962).

## MATERIAAL EN METHODEN

## 2.1. Celkweken

Proeven met Coxsackie A 21-virus (enterovirus 24) werden verricht in celkweken. Er werd gebruik gemaakt van kweken van verse menselijke organen en van celkweken, die gedurende langere tijd in het laboratorium zijn voortgekweekt, zgn. cellijnen.

2.1.1. *Verse celkweken.* Voor de verse weefselkweken werd gebruik gemaakt van nieren van pasgeborenen en van schildklieren, die operatief bij patiënten waren verwijderd. De nieren werden verkregen van immatuuren, prematuren of voldragen kinderen, die tijdens of kort na de partus waren overleden. Binnen 2 uren post mortem werden de organen verwijderd en opgevangen in een conserveringsvloeistof, die bestond uit Hanks' gebufferde zoutoplossing, waaraan was toegevoegd 20% kalverserum, 200 E penicilline en 200 gamma streptomycine per ml vloeistof. De nieren werden in deze vloeistof naar het laboratorium vervoerd, waar zij in afwachting van de bewerking bij een temperatuur van 4° C werden geplaatst. In de regel vond de bewerking binnen 6 uren na de verwijdering plaats. Voor de celkweek werd na verwijdering van kapsel en ureter het gehele nierweefsel, zowel schors als merg, gebruikt.

De verse celkweken werden bereid volgens de methode, die reeds door Smeur (1961) voor apeniercellen is beschreven.

2.1.2. *Cellijnen.* Een aantal cellijnen, die in ons laboratorium aanwezig waren, zijn onderzocht op de gevoeligheid voor Coxsackie A 21-virus. Een celkweek, die gedurende minstens één jaar continu in het laboratorium is aangehouden, werd als een cellijn beschouwd.

De cellijnen werden gekweekt volgens de methode, die voor de HeLa-celijn is beschreven (Kok, 1957). De enige wijziging, die voor de verschillende celsoorten werden aangebracht, betrof het soort en de hoeveelheid serum in het kweekmedium.

Gegevens betreffende de herkomst van de gebruikte cellijnen zijn in Tabel 4 weergegeven. Wij ontvingen de KB-celijn van Dr. J. G. Kapsenberg, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht en de HeLa-celijn van Dr. V. Swaen, Pathologisch-Anatomisch Laboratorium, Katholieke Universiteit te Nijmegen. De T<sub>1</sub>-, T<sub>5b</sub>-, T<sub>12</sub>- en T<sub>13</sub>-cellijnen



werden ontwikkeld in het Virologisch Laboratorium van het St. Elisabeth-Ziekenhuis te Tilburg.

Tabel 4. *Gegevens van gebruikte cellijnen*

Cellijn	Herkomst		Literatuur
	Species	Orgaan	
HeLa	Mens	Cervixcarcinoom	Gey e.m., 1952
KB	Mens	Farynxtumor	Eagle, 1955
T <sub>1</sub>	Mens	Nier	van der Veen e.m., 1958
T <sub>5b</sub>	Kalf	Lenskapsel	van der Veen e.m., 1959
T <sub>12</sub>	Mens	Schildklier	
T <sub>13</sub>	Varken	Nier	

De T<sub>12</sub>-cellijn is afkomstig van schildklierweefsel, dat in mei 1958 operatief bij een patiënt van 41 jaar werd verwijderd. Voor de verse kweek is uitgegaan van weefselfragmenten. Het weefsel groeide uit met fibroblastachtige en epitheloïde cellen. Vanuit een kweek, waarin de epitheloïde cellen overheersten, werd door regelmatige omzettingen de T<sub>12</sub>-cellijn verkregen. De cellen zijn tussen de 45e en 50e omzetting gebruikt.

De T<sub>13</sub>-cellijn is afkomstig van nierweefsel van een varken, dat in november 1958 werd geslacht. De cellen voor de verse kweek zijn verkregen door trypsineren van het schorsweefsel van de nier. De cellen toonden een epitheloïd aspekt, dat na omzettingen onveranderd is gebleven. De cellen zijn tussen de 30e en 35e omzetting gebruikt.

2.1.3. *Celstammen.* Een deel van het materiaal voor virologisch onderzoek werd geënt in diploïde cellen (celstammen), die afkomstig waren van menselijk foetaal longweefsel. Er werden twee celstammen gebruikt: „Gabi”-cellen, die welwillend werden afgestaan door Dr. J. G. Kapsenberg, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht, en WI-38-cellen, die afkomstig waren van Flow Laboratories, Rockville, Md., Verenigde Staten. Twee maal in de week werden de cellen omgezet volgens de methode, die door Hayflick en medewerkers (1961) is beschreven. Bij elke omzetting werden kweken in buizen aangelegd.

De cellen, die voor de isolatieproeven werden gebruikt, waren in ons laboratorium 2 tot 10 maal omgezet.

## 2.2. Media

2.2.1. *Kweekmedia*. Een mengsel van gebufferde zoutoplossing volgens Hanks en 0,5% laktalbumine hydrolysaat vormde de basis van de kweekmedia voor alle celsoorten. Slechts het soort serum en de hoeveelheid serum, die aan het medium werden toegevoegd, varieerden al naar de celsoort.

De samenstelling van het medium kan in principe, als volgt, worden aangegeven:

Laktalbumine hydrolysaat	0,500 g
Natriumbicarbonaat	0,035 g
Penicilline	5000 E
Streptomycine	5000 gamma
Serum	X ml
Hanks' oplossing	(100 — X) ml

Hierbij is X de hoeveelheid serum, die al naar de celsoort varieert.

Verse celkweken werden aangelegd met medium, dat 20% kalverserum bevatte. HeLa-cellen werden in media gekweekt, die verschillende soorten serum bevatten, respektievelijk 5% paardeserum, 5% kalverserum en 20% paardeserum. T<sub>1</sub>-cellen werden gekweekt in medium met 5% kalverserum, KB- en T<sub>12</sub>-cellen in medium met 10% kalverserum, T<sub>5b</sub>- en T<sub>13</sub>-cellen in medium met 20% kalverserum. Diploïde cellen werden gekweekt in medium bereid volgens Eagle (1955), waaraan 10% kalverserum was toegevoegd.

2.2.2. *Onderhoudsmedia*. Kweken van HeLa-cellen, die waren beënt met virus, werden aangehouden in onderhoudsmedium, dat dezelfde samenstelling had als bovengenoemde kweekmedium. De serumkomponent bestond uit 2,5% kippeserum. Voor neutralisatieproeven in HeLa-celkulturen werd een dubbele hoeveelheid natriumbicarbonaat gebruikt om het bufferende vermogen te vergroten.

Het onderhoudsmedium voor verse celkweken en celstammen bestond uit „tissue culture” (TC) medium 199 (Difco) als basis, waaraan 2,5% kippeserum werd toegevoegd. De samenstelling is als volgt:

Natriumbicarbonaat	0,07 g
Penicilline	5000 E
Streptomycine	5000 gamma

Kippeserum	2,5 ml
TC medium 199	97,5 ml

Bij de bereiding van hemagglutinerend antigeen werd het serum weggelaten, daar dit het uitzakkingspatroon van de erythrocyten verstoorde.

### 2.3. Virologisch onderzoek

Het materiaal, dat op de aanwezigheid van virus werd onderzocht, bestond uit sekreet van de keel. Het sekreet werd verkregen door een wattedrager, die tevoren in serum was gedrenkt en geautoklaveerd, over de achterste farynxwand af te strijken. De wattedrager werd vervolgens goed gemengd met 2 ml GLY (gelatine, laktalbumine hydrolysaat, „yeast” extrakt) konserveringsmedium (Smeur, 1961). Daarna werd het stokje, waaraan de wat was bevestigd, afgebroken. In afwachting van het vervoer naar het laboratorium werd het materiaal ter plaatse gekonserveerd bij  $-70^{\circ}\text{C}$  in een vat met koolzuurijs. In het laboratorium vond konservering plaats in een elektrische diepvrieskast van  $-50^{\circ}\text{C}$ .

Proeven om virus te isoleren werden verricht in 3 soorten cellen: HeLa-, menselijke nier- en schildkliercellen. Van elke celsoort werden 2 buizen beënt.

De buisjes met de afgebroken wattedragers werden voor de enting bij kamertemperatuur ontdooid. Met een steriele pincet werden de wattedragers goed tegen de wand van het buisje uitgeperst en daarna verwijderd. Om grove bestanddelen en bacteriën te verwijderen werd de vloeistof gedurende 10 minuten op 3000 rpm gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd geënt in buizen met 3-4 dagen oude celkweken, die een dag vóór de enting en tegelijk met de enting van vers onderhoudsmedium (2.2.2.) waren voorzien. Per buis werd 0,1 ml vloeistof geënt.

De beënte celkweken werden in een trommel, die 12 omwentelingen per uur maakte, bij  $35^{\circ}\text{C}$  geïnkubeerd. Het aspect van de cellen werd dagelijks met een 100-voudige vergroting onder de mikroskoop gecontroleerd. Om de 3-4 dagen werd het medium vervangen door vers onderhoudsmedium. Indien het aspect van de cellen afweek van dat van onbeënte cellen of indien de cellen een voor enterovirus karakteristiek, cytopathologisch effect toonden, werden de buizen niet meer ververst, doch bij  $-20^{\circ}\text{C}$  geplaatst in afwachting van passage of determinatie. Ter controle werden voor iedere celsoort steeds 4 buizen niet beënt, doch overigens op dezelfde wijze behandeld als de beënte buizen. Wanneer de onbeënte controlebuizen door overpopulatie aspecifieke degene-

ratieverschijnselen toonden, welke voor de HeLa-cellen in de regel na 7 dagen en voor de verse celkweken na 10 dagen optraden, werden alle buizen, beënte en onbeënte buizen, bij  $-20^{\circ}$  C geplaatst.

Het bevroren materiaal werd gepasseerd in celkweken, die 3-4 dagen oud waren. In totaal werd het te onderzoeken materiaal gedurende 20-21 dagen voortgekweekt, voordat het als negatief werd beschouwd. Voordat het materiaal werd gepasseerd, werd het 3 maal bij  $-20^{\circ}$  C bevroren en bij kamertemperatuur ontdooit. Bij passages werd per buis 0,2 ml vloeistof geënt. Onbeënte celkulturen werden op dezelfde wijze behandeld en gepasseerd als beënte celkweken.

Positieve monsters werden met behulp van specifiek antiserum door middel van de neutralisatiereactie gedetermineerd.

Ter controle op eventuele luchtinfecties lieten wij tijdens de bewerking van het materiaal twee buizen met celkulturen, die niet waren beënt, aan de lucht open staan. Deze buizen werden verder op dezelfde wijze behandeld en gepasseerd als de beënte buizen.

## 2.4. Serologisch onderzoek

Voor het onderzoek op de aanwezigheid van antistoffen werden 3 reacties toegepast: de neutralisatie-, de komplementbindings- en de hemagglutineringsremmingsreactie. Het onderzoek werd verricht met gepaarde sera. Bij patiënten werd in de akute fase van de ziekte en in de derde ziekte week bloed afgenomen. Bij gezonde controle-personen bedroeg de periode tussen de twee sera 6 weken. Sera van één persoon werden steeds gelijktijdig in één proef onderzocht.

2.4.1. *Bereiding van virusantigenen.* Virussuspensies zijn bereid van een niet-hemagglutinerende Coxsackie A 21-virusstam, stam V58 - 5178, die in het laboratorium te Tilburg was geïsoleerd (van der Veen e.m., 1960) en een hemagglutinerende stam „Bouma”, No. 48560, die wij van Dr. K. M. Johnson te Bethesda, Verenigde Staten, ontvingen.

Antigenen voor de neutralisatiereactie, de komplementbindingsreactie en het immuniseren van dieren zijn alle bereid van de stam V58 - 5178. Om het virus te zuiveren van eventuele andere agentia, die in het oorspronkelijke materiaal van de patiënt aanwezig waren, werd de virusstam, nadat ze enkele malen in schildkliercellen was gepasseerd, enkele malen in hoge verdunningen in HeLa-cellen gepasseerd. Bij de passages werd het materiaal gebruikt van de hoogste verdunning, waarin virus kon worden aangetoond. De gezuiverde virusstam en de oorspronkelijke stam bleken identiek te reageren met antisera tegen respectievelijk stam V58 - 5178 en tegen de stam „Coe” van Coxsackie

A 21-virus. Van het gezuiverde, aan HeLa-cellen aangepaste virus is een voorraad gemaakt, die gebruikt is voor de bereiding van de bovengenoemde antigenen.

Voor de bereiding van virussuspensies werden HeLa-cellen gebruikt, die waren gekweekt in flessen in medium met 20% paardeserum (2.2.1.). De celkulturen waren 3-4 dagen oud op het tijdstip van enting en bevatten ongeveer  $4 \times 10^6$  cellen. Per fles werd ongeveer  $10^6$  TCID<sub>50</sub> virus geënt. Onder 1 TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infectious Dose<sub>50</sub>) werd verstaan een hoeveelheid virus, die in staat was een cytopathologisch effect te veroorzaken bij de helft van het aantal celkweken, die met deze dosis virus waren beënt. Het onderhoudsmedium, dat na de virusenting aan de celkweken werd toegevoegd, bestond uit 0,5% laktalbumine hydrolysaat in Hanks' gebufferde zoutoplossing met 2,5% kippeserum (2.2.2.). Voor de bereiding van antigeen voor het immuniseren van caviae werd TC medium 199 gebruikt zonder toevoeging van serum. De beënte flessen werden stationair bij 35° C geïnkubeerd. Na 24 uren was een cytopathologisch effect waarneembaar. Na 3 dagen waren de cellen voor 80-90% door het virus aangetast. Op dit tijdstip werden de vloeistoffen verzameld, nadat de celkulturen 3 maal bij -20° C waren bevroren en bij kamertemperatuur waren ontdooid. Ten gevolge van deze behandeling werden de cellen gedesintegreerd en kwam het in de cellen aanwezige virus vrij in de vloeistof. Het geoogste materiaal werd bij -20° C bewaard.

Voor de bereiding van virussuspensies voor de hemagglutinatie-reactie werd de stam „Bouma”, No. 48560, gebruikt. Het virus werd gekweekt in verse celkulturen, namelijk in kweken van vers menselijk nier- of schildklierweefsel. Flessen met celkulturen, die 6-7 dagen oud waren en een aaneengesloten laag vormden, werden beënt met  $0,5 \text{ à } 1 \times 10^{5,0}$  TCID<sub>50</sub> virus per fles. De celkweken werden aangehouden in TC medium 199 zonder serum. Ze werden stationair bij 35° C geïnkubeerd. Na 3 dagen waren de cellen voor 90-100% aangetast. Op dit tijdstip werden de vloeistoffen verzameld, nadat de celkulturen 3 maal waren bevroren en ontdooid. Het geoogste materiaal werd bij -20° C bewaard. Voor het gebruik in de hemagglutinatiereactie werden de celresten door centrifugeren verwijderd.

Ter controle werd tegelijkertijd met de beënting van celkulturen met virus een aantal celkweken beënt met controlevloeistof, die geen virus bevatte, maar overigens op dezelfde wijze was samengesteld als de virus houdende vloeistof. Deze celkweken werden op dezelfde wijze behandeld als de met virus beënte celkulturen.

2.4.2. *Bereiding van antisera.* Een specifiek antiserum voor de determinatie van Coxsackie A 21-virus werd bereid bij konijnen. Voor de immunisatie van konijnen werd een virussuspensie (2.4.1.) gebruikt, waarvan de celresten waren verwijderd door centrifugeren op 3000 rpm gedurende 10 minuten. De suspensie bevatte  $10^{5,0}$  TCID<sub>50</sub> per 0,1 ml.

Konijnen met een gewicht van 2,5 à 3,5 kg, werden 5 maal — met een tussenpoos van 3-4 dagen — intraveneus ingespoten met 1,5 ml virussuspensie ( $1,5 \times 10^{6,0}$  TCID<sub>50</sub>). Eén week na de laatste inspuiting kregen de dieren een „booster”-dosis van 2,5 ml virussuspensie ( $2,5 \times 10^{6,0}$  TCID<sub>50</sub>), eveneens intraveneus.

Voor het begin van de immunisatie werd door middel van hartpunctie 10-15 ml bloed afgenomen en 5 dagen na de „booster”-dosis werden de konijnen verbloed. De aanwezigheid van antistoffen werd bepaald door middel van de neutralisatiereactie. De titers van de op deze wijze verkregen antisera lagen in de grootte-orde van 256 - 1024. In de sera, die voor de immunisatie waren afgenomen, konden geen neutraliserende antistoffen worden aangetoond.

Verder werden antisera bereid bij caviae. Dieren van 250-300 g werden intramuskulair ingespoten met 1 ml virussuspensie ( $10^{6,0}$  TCID<sub>50</sub>). Na 3 weken werd nogmaals een dosis van 1,0 ml toegediend, eveneens intramuskulair. Vóór de immunisatie werd bloed afgenomen en 5 dagen na de laatste inspuiting werden de dieren verbloed. De sera van elk dier afzonderlijk werden op antistoffen onderzocht. Sera, waarin in een verdunning van 1 op 256 of hoger neutraliserende antistoffen aantoonbaar waren, werden gepoold.

Een aantal caviae werd intranasaal besmet met 0,2 ml virussuspensie ( $2 \times 10^{5,0}$  TCID<sub>50</sub>). De besmetting leidde niet tot de vorming van aantoonbare neutraliserende of hemagglutinatieremmende antistoffen.

2.4.3. *Neutralisatiereactie.* Neutralisatiereacties werden verricht in HeLa-cellen, die waren gekweekt in medium met 20% paardeserum (2.2.1.). Het antigeen voor de reactie werd bereid volgens de boven beschreven methode (2.4.1.). Voor het gebruik werden de celresten door centrifugeren verwijderd.

De reactie werd uitgevoerd volgens de methode, welke voor adeno-virussen wordt gebruikt en uitvoerig is beschreven door Kok (1957) en van der Ploeg (1959). De hoeveelheid virus en de bepaling van het eindpunt van de neutralisatie werden voor Coxsackie A 21-virus gewijzigd. Voor de reactie werd een virussuspensie gebruikt, die 100 TCID<sub>50</sub> per 0,1 ml bevatte. De dosis virus was bepaald door middel van

een titratie, die na 3 dagen was afgelezen. Voor kwantitatieve reacties werden de sera verdund in een 4-voudige verdunningsreeks van 1/4 tot en met 1/256. Voor kwalitatieve reacties werd een serumverdunding van 1/4 gebruikt. Gelijke delen virus en serumverdunding werden bij elkaar gevoegd en gedurende 4 uren bij kamertemperatuur of gedurende een nacht bij 4° C geïnkubeerd. Daarna werd het mengsel op de cellen gebracht. De beënte celkweken werden stationair bij 35° C geïnkubeerd. Zij werden na 3 dagen zonder kennisname van de inhoud, zgn. „blind”, onder de mikroskoop onderzocht op de aanwezigheid van een door virus veroorzaakt cytopathologisch effect.

Proeven, die op verschillende tijdstippen waren verricht, werden alleen met elkaar vergeleken,

1. indien uit een virustitratie, die tegelijkertijd met de neutralisatiereactie was ingezet, bleek, dat er in de proef niet meer dan 300 TCID<sub>50</sub> en niet minder dan 30 TCID<sub>50</sub> virus was gebruikt, en
2. indien de titer van een bekend positief serum, dat bij iedere proef werd onderzocht, niet meer dan 2-voudig verschilde van de tevoren bepaalde titer van dit serum.

De hoogste serumverdunding (beginverdunding van het serum voordat virus is toegevoegd), die in één van de twee buizen het cytopathologische effect volledig remt of in beide buizen meer dan 90% van de cellen intact laat, werd beschouwd als titer van neutraliserende antistoffen. De titer werd uitgedrukt in de reciproke waarde van de serumverdunding.

Geïsoleerde virusstammen werden geïdentificeerd door middel van neutralisatiereacties met specifiek antiserum. Er werd voor deze proeven een verdunding van het antiserum gebruikt, die 10 maal meer gekoncentreerd was dan de titer van het antiserum.

**2.4.4. Komplementbindingsreactie.** Antigeen werd bereid volgens de boven beschreven methode (2.4.1.). Aanvankelijk werden de celresten door centrifugeren verwijderd. Het bleek echter, dat de opbrengst van het antigeen aanzienlijk hoger werd, indien de vloeistof, waarin de celresten nog aanwezig waren, met ultrasonore trillingen werd behandeld. De celresten werden gekoncentreerd door middel van centrifugeren en vervolgens gedurende 3 minuten in een ijswaterbad aan ultrasonore trillingen blootgesteld. De troebele suspensie werd gedurende 10 minuten op 3000 rpm gecentrifugeerd om het celdebris te verwijderen. De bovenstaande vloeistof werd daarna aan de oorspronkelijke vloeistof toegevoegd. Voor het gebruik werd de virussuspensie gedurende 30 minuten

bij 56° C geïnactiveerd. De titer van het antigeen werd bepaald door middel van een bloktitratie met een „pool” van positieve sera van mensen; de titer van het antigeen varieerde in de regel van 1/2 tot 1/4.

De komplementbindingsreacties werden uitgevoerd in Perspex-platen volgens de in het laboratorium gebruikelijke methode (van der Veen, 1953).

De hoogste serumverdunding (beginverdunding van het serum in een volume-eenheid), waarbij meer dan 75% van het komplement werd gebonden en een vrijwel volledige remming (3 à 4+) optrad, werd beschouwd als titer van komplementbindende antistoffen. De titer werd uitgedrukt in de reciproke waarde van de serumverdunding.

2.4.5. *Hemagglutinatie- en hemagglutinatieremmingsreactie.* De hemagglutinatiereacties werden verricht volgens de methode, die door Johnson en medewerkers (1961) voor Cocksackie A 21-virus is beschreven. Virussuspensies werden met menselijke O-erythrocyten bij 4° C geïnkubeerd; 0,85% fysiologisch zoutoplossing werd als verdunningsvloeistof gebruikt. Hemagglutinatie werd vastgesteld aan de hand van het uitzakkingspatroon van de erythrocyten.

De reacties werden uitgevoerd in Perspex-platen, die voorzien waren van kommetjes met konkave bodem. Virussuspensies werden verdund in een 2-voudige verdunningsreeks. Aan een kommetje werd 0,4 ml virusverdunding toegevoegd. O-erythrocyten, die met steriele Alsever oplossing (Smeur, 1961) waren gekonserveerd, werden voor het gebruik 3 maal in koud fysiologisch zout gewassen. Met behulp van de hematokrietwaarde van de gewassen suspensie werd een 0,8% suspensie gemaakt. Hiervan werd 0,2 ml aan de virusverdundingen toegevoegd. De erythrocyten en het virus werden met een houten stokje goed gemengd. Vervolgens werden de platen gedurende 90-120 minuten bij 4° C geïnkubeerd. De erythrocyten werden op auto-agglutinatie gecontroleerd door in een aantal kommetjes van elke plaat 0,4 ml fysiologisch zout en 0,2 ml erythrocytensuspensie te brengen. De reactie werd afgelezen, zodra de erythrocyten in de kommetjes zonder virus volledig waren uitgezakt. Dit was in de regel het geval na inkubatie gedurende 90 tot 120 minuten. De reactie werd makroskopisch afgelezen. Nietgeagglutineerde erythrocyten zakken in een fraaie ring uit, terwijl geagglutineerde erythrocyten de bodem van de kommetjes gelijkmatig bedekken. Overgangspatronen, die duiden op partiële agglutinatie, werden waargenomen.

De titer van een virussuspensie werd uitgedrukt in de reciproke



waarde van de hoogste beginverdunding van de virussuspensie, die meer dan 90% van de erythrocyten agglutineerde. Wij hebben aangenomen, dat deze beginverdunding 1 agglutinatie-eenheid (AE) virus bevatte per 0,4 ml.

In de hemagglutinatieremmingsreactie werd antigeen gebruikt, dat van de stam „Bouma”, No. 48560, was bereid (2.4.1.). Wij hebben deze stam gekozen, omdat de in ons laboratorium geïsoleerde stammen geen of weinig hemagglutinerend vermogen bezaten. In de neutralisatiereacties werden geen antigene verschillen gevonden tussen stam „Bouma” en de stammen „Coe” en V58 - 5178 anderzijds.

De te onderzoeken sera werden in buisjes 1/5 verdund en gedurende 30 minuten bij 56° C geïnactiveerd. De verdunde sera werden vervolgens geadsorbeerd met een gelijke volume kaoline gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur volgens de methode door Rosen (1960) beschreven voor de hemagglutinatieremmingsreactie met adenovirus. De kaoline werd verwijderd door gedurende 5 minuten op 2500 rpm te centrifugeren. Sera van mensen werden vervolgens zonder verdere behandeling verdund in een 2-voudige reeks van 1/10 tot en met 1/10.240. Sera van caviae werden alvorens te verdunnen geadsorbeerd met „packed cells” van menselijke O-erythrocyten gedurende 1 uur bij 4° C.

De reacties werden evenals de hemagglutinatiereacties in Perspex-platen verricht. Sera werden in de kommetjes met een verende spuit in 0,2 ml fysiologisch zout verdund. Aan de serumverdundingen werd 0,2 ml van een virussuspensie toegevoegd, die 4 AE per 0,2 ml bevatte. Aan de serumverdunding 1/10 werd in plaats van virus 0,2 ml fysiologisch zout toegevoegd. Dit kommetje diende als controle op de aanwezigheid van agglutinerende factoren in het serum. De serumverdundingen en het virus werden gemengd door de plaat goed heen en weer te schuiven over een glad oppervlak. De mengsels werden gedurende 4 uren bij kamertemperatuur geïnkubeerd. Vervolgens werd hieraan 0.2 ml van een 0,8% erythrocytensuspensie toegevoegd. Om het uitzakingspatroon te controleren en eventuele auto-agglutinatie te kunnen waarnemen werden aan een aantal kommetjes uitsluitend fysiologisch zout en erythrocyten toegevoegd. De erythrocyten werden met behulp van houten stokjes zorgvuldig gemengd met het mengsel van virus en serum. Bij iedere proef werd steeds een virustitratie verricht om te controleren of het juiste aantal (4 AE) agglutinatie-eenheden was gebruikt. De platen werden gedurende 90 tot 120 minuten bij 4° C geplaatst. De

reakties werden afgelezen, zodra de erythrocyten in de kommetjes zonder virus volledig waren uitgezakt.

De hoogste serumverdunding (beginverdunding van het serum, voordat virus is toegevoegd), waarbij 50% van de erythrocyten niet was geagglutineerd, werd als titer beschouwd. Wanneer er een scherpe overgang was en er in twee opeenvolgende kommetjes respektievelijk in het geheel geen agglutinatatie en volledige agglutinatatie werd waargenomen, werd de tussenliggende waarde van de serumverdundingen in de beide kommetjes als titer aangenomen. De titers werden in de reciproke waarde van de serumverdunding uitgedrukt.

2.4.6. *Serologische reacties met andere virussen.* De door ons gebruikte sera zijn in het kader van andere onderzoeken eveneens onderzocht op komplementbindende antistoffen tegen adenovirus en influenza A- en B-virus (Dijkman, 1963). Voor de reacties met adenovirus werd de prototype stam van adenovirus type 4 gebruikt, die in HeLa-cellen was gekweekt. Voor het onderzoek op influenza werd gebruik gemaakt van „soluble” antigeen van influenza A- (stam PR-8) en B-virus (stam Lee), dat bereid was in kippe-eieren.

## 2.5. Herkomst van het materiaal voor virologisch en serologisch onderzoek

Het onderzoek werd verricht bij militairen uit de legerplaats Ossendrecht in de periode van oktober 1960 tot april 1964. Voor nadere gegevens over de plaats van het onderzoek en over de personen, die bij het onderzoek zijn betrokken, moge worden verwezen naar de proefschriften van Prins (1959) en Dijkman (1963). Van militairen met een akute aandoening van de luchtwegen en een rektale temperatuur van 38,0° C of hoger, die op de ziekenzaal waren opgenomen, werd tijdens de akute fase van de ziekte keelsekreet en bloed afgenomen. Ongeveer 14 dagen later werd bij hen een tweede monster bloed verzameld. Behalve bij patiënten werd ook bij willekeurig gekozen, gezonde rekruten onderzoek verricht. Bij hen werd direkt na opkomst in dienst en in de 8ste week van de opleiding, bloed afgenomen voor serologisch onderzoek. Wij hebben een interval van ongeveer 7 weken gekozen, omdat dit overeenkomt met de periode van de basis-opleiding. Daarna werden de meeste rekruten overgeplaatst naar andere militaire centra om een voortgezette opleiding te ontvangen.

Verder werd onderzoek verricht bij kinderen, die in de jaren 1961, 1963 en 1964 waren opgenomen op de kinderafdelingen van het St. Rad-

boud-Ziekenhuis en St. Canisius-Ziekenhuis te Nijmegen. Materiaal van patiëntjes, die verschijnselen toonden van een akute aandoening van de luchtwegen en/of longen, werden door ons onderzocht. Keelsekreet en bloed werden bij opneming van de patiëntjes afgenomen, bij wie een luchtweginfectie was vastgesteld. Een tweede monster bloed werd in de regel 10-14 dagen later afgenomen.

ONDERZOEK VAN ENKELE EIGENSCHAPPEN VAN  
COXSACKIE A 21-VIRUS

Met het oog op de virologische diagnostiek leek het ons wenselijk een nader onderzoek te verrichten naar de gevoeligheid van verschillende soorten cellen voor Coxsackie A 21-virus en naar de vorming van hemagglutinenen. Bovendien werd een onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus bij dieren.

3.1. Gevoeligheid van verschillende cellijnen voor  
Coxsackie A 21-virus

Wij hebben de gevoeligheid voor Coxsackie A 21-virus onderzocht van een aantal cellijnen, die afkomstig waren van weefsels van de mens. Sommige cellijnen waren afkomstig van maligne weefsels, zoals de HeLa- en KB-celijn, andere lijnen van normale weefsels, zoals T<sub>1</sub>- en T<sub>12</sub>-celijn. Bovendien werd de gevoeligheid onderzocht van twee cellijnen (T<sub>5b</sub> en T<sub>13</sub>), die afkomstig waren van weefsels van dieren. Nadere gegevens over deze cellijnen zijn vermeld in Hoofdstuk II, 2.1.2.

De cellijnen werden beënt met de stam V58-5178, die in een kultuur van vers schildklierweefsel was gekweekt. Van elke celsoort werden 2 buizen met onverdunde virussuspensie en 2 buizen met een 100 maal verdunde virussuspensie beënt. Per buis werd 0,1 ml geënt. Het onderhoudsmedium was voor alle celsoorten gelijk en bestond uit 0,5% laktalbumine hydrolysaat in Hanks' gebufferde zoutoplossing en 2% kalverserum. De beënte buizen en een aantal onbeënte, doch overigens op dezelfde wijze behandelde buizen, werden stationair bij 35° C geïnkubeerd. De celkulturen werden dagelijks onder de mikroskoop gecontroleerd. Indien meer dan 80% van de cellen door virus was aangetast, werd het materiaal (cellen, celresten en bovenstaande vloeistof) geoogst en gepasseerd in nieuwe kulturen van de betreffende cellijn. Voordat het materiaal werd gepasseerd, werd het 3 maal bij -20° C bevroren en bij kamertemperatuur ontdooid. Het materiaal werd onverdund en 1 op 100 verdund gepasseerd. Er werden in elke celsoort drie passages verricht na een inkubatieperiode van gemiddeld 7 dagen. De uitkomsten van het onderzoek zijn weergegeven in Tabel 5. In de tabel is aangegeven op welke dag voor het eerst een cytopatho-

logisch effect werd waargenomen en op welke dag meer dan 80% van de cellen was aangetast.

Tabel 5. *Gevoeligheid van verschillende cellijnen voor Coxsackie A 21-virus*

Cellijn	Passage van onverdund virus			Passage van 100 maal verdund virus		
	1e pass.	2e pass.	3e pass.	1e pass.	2e pass.	3e pass.
	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag
KB	1e <sup>3)</sup> → 2e <sup>4)</sup>	1e → 2e	1e → 1e	3e → 4e	3e → 4e	1e → 3e
HeLa(P) <sup>1)</sup>	1e → 6e	1e → 3e	1e → 3e	2e → >6e	2e → 3e	2e → 3e
T <sub>1</sub>	1e → 8e	1e → 3e	1e → 3e	2e → 8e	2e → 6e	2e → 8e
HeLa(KA) <sup>2)</sup>	2e → >7e	1e → 3e	1e → 3e	3e → >7e	4e → 6e	2e → 3e
T <sub>12</sub>	8e → >8e	3e → 3e	3e → 3e	— <sup>5)</sup>	—	—
T <sub>5b</sub>	—	—	—	—	—	—
T <sub>13</sub>	—	—	—	—	—	—

1) HeLa-celijn gekweekt in medium met 5% paardeserum.

2) HeLa-celijn gekweekt in medium met 5% kalverserum.

3) Dag, waarop voor het eerst cytopathologisch effect werd waargenomen.

4) Dag, waarop meer dan 80% van de cellen waren aangetast.

5) Geen cytopathologisch effect waarneembaar op de 6e tot 8e dag na enting.

Uit Tabel 5 blijkt, dat reeds één dag na enting van onverdund virus in gevoelige cellijnen een cytopathologisch effect zichtbaar is. Men vindt op dit tijdstip enkele groepjes cellen, die hoekiger en sterker lichtbrekend zijn. In het verloop van een dag ronden deze cellen zich af, schrompelen en laten voor het merendeel los van de glaswand. In dezelfde tijd breiden de haardjes zich uit en vormen zich nieuwe veldjes van aangetaste cellen. In de derde passage zijn de meeste cellen na enkele dagen aangetast. Het is opmerkelijk, dat vrijwel steeds ongeveer 10-20% van de cellen onaangetast bleef.

Alle cellijnen, die afkomstig waren van weefsels van de mens, bleken gevoelig te zijn voor Coxsackie A 21-virus. In kweken van HeLa- en KB-cellen werden iets eerder afwijkingen waargenomen dan in die van T<sub>1</sub>- en T<sub>12</sub>-cellen. De T<sub>12</sub>-cellen waren weinig gevoelig; 1 op 100 verdund virus veroorzaakte geen veranderingen in deze cellen.

In de beide cellijnen (T<sub>5b</sub> en T<sub>13</sub>), die afkomstig waren van

weefsels van dieren (respektievelijk lenskapsel van een kalf en nierweefsel van een varken), werd geen cytopathologisch effect waargenomen. Dit wijst erop, dat deze cellijnen niet of zeer weinig gevoelig zijn voor Cocksackie A 21-virus.

### 3.2. Invloed van het onderhoudsmedium op de virusproduktie in HeLa-cellen

Wij hebben nagegaan of de samenstelling van het onderhoudsmedium invloed had op de virusvermenigvuldiging. Zowel de serumkomponent als de aminozuurbron werd onderzocht.

3.2.1. *Vergelijking van sera van verschillende soorten dieren.* Natuurlijke infecties van dieren met virussen uit de Cocksackie-virusgroep zijn niet beschreven. De mogelijkheid mag echter niet worden uitgesloten. Cocksackie A-virus type 4 is geïsoleerd uit het bloed van wilde konijnen, nadat de dieren in aanraking waren geweest met grond, die besmet was met van de mens afkomstig virus (O'Connor e.m., 1955). Verder zijn in sera van huisdieren, o.a. varkens en koeien, neutraliserende stoffen tegen Cocksackie-virussen aangetoond (Pohjanpelto, 1956). Op grond van deze literatuurgegevens leek het van belang sera van verschillende soorten dieren te onderzoeken op virusremming. Het onderzoek werd beperkt tot sera van dieren, welke als routine in het laboratorium worden gebruikt. De sera waren afkomstig van paarden, kalveren, konijnen en kippen. Voor het onderzoek werden sera van 2-5 dieren gepoold. De sera werden voor het gebruik gedurende 30 minuten bij 56° C geïnactiveerd. De proeven werden uitgevoerd in HeLa-cellen, die werden gekweekt in flessen. Een dag voor de enting en op de dag van enting werden de celkweken voorzien van onderhoudsmedium, dat bestond uit 0,5% laktalbumine hydrolysaat in Hanks' gebufferde zoutoplossing en 5% serum. De celkweken werden beënt met 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub> virus (stam V58-5178). Vervolgens werden de flessen stationair bij 35° C geplaatst. Na 3 dagen werd het materiaal (cellen, celresten en bovenstaande vloeistof) geoogst. Het materiaal werd 3 maal bij -20° C bevroren en bij kamertemperatuur ontdooid, waarna grove celresten gedurende 5 minuten op 3000 rpm werden afgedraaid. Daarna werd de titer van de virussuspensies bepaald. De titraties werden verricht in HeLa-cellen, die na toevoeging van virus werden aangehouden in medium met 5% kalverserum. De verschillende virussuspensies werden in één proef getitreerd. De resultaten zijn in Tabel 6 weergegeven.

Tabel 6. *Produktie van Coxsackie A 21-virus in aanwezigheid van sera van verschillende soorten dieren*

Serumkomponent van het onderhoudsmedium	Virusopbrengst (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /0,1 ml)
5% kalverserum	4,5
5% paardeserum	5,0
5% konijneserum	6,0
5% kippeserum	6,0

Het blijkt, dat de virusproduktie het hoogste is, indien het medium 5% konijne- of 5% kippeserum bevat.

3.2.2. *Vergelijking van media met verschillende samenstelling.* Het mengsel van Hanks' gebufferde zoutoplossing en laktalbumine hydrolysaat werd vergeleken met een synthetisch medium, TC medium 199 (Difco), dat bestaat uit een oplossing van essentiële aminozuren en vitaminen in Hanks' gebufferde zoutoplossing.

De proeven werden uitgevoerd op de wijze, die boven is beschreven (3.2.1.). De onderhoudsmedia waren als volgt samengesteld:

1. TC medium 199 met 5% kalverserum
2. 0,5% laktalbumine hydrolysaat in Hanks' gebufferde zoutoplossing met 5% kalverserum
3. TC medium 199 zonder toevoeging van serum.

De resultaten van het onderzoek zijn in Tabel 7 weergegeven.

Tabel 7. *Produktie van Coxsackie A 21-virus in aanwezigheid van media met verschillende samenstelling*

Onderhoudsmedium	Virusopbrengst (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /0,1 ml)
TC medium 199 + 5% kalverserum	6,0
Laktalbumine hydrolysaat in Hanks' oplossing + 5% kalverserum	5,5
TC medium 199 zonder serum	6,0

Er blijkt geen noemenswaardig verschil in virusopbrengst te zijn tussen celkweken, die werden aangehouden in synthetisch medium en celkweken, die werden aangehouden in medium met laktalbumine hydrolysaat. Verder blijkt het kalverserum in aanwezigheid van TC medium 199 de virusopbrengst niet te remmen. De virusopbrengst bij gebruik van laktalbumine hydrolysaat met kalverserum lijkt in deze proef groter te zijn dan die in de vorige proef, waarbij de invloed van serum op de virusproductie werd onderzocht (vergelijk Tabel 6, 3.2.1.). De uitkomsten van beide proeven mogen echter niet rechtstreeks met elkaar worden vergeleken, omdat ze op verschillende tijdstippen zijn uitgevoerd.

Uit deze proeven blijkt, dat de hoogste virustiters zijn verkregen bij gebruik van laktalbumine hydrolysaat waaraan konijne- of kipserum is toegevoegd en TC medium 199 zonder toevoeging van kalverserum. Wij hebben voor de verdere proeven voorkeur gegeven aan medium met laktalbumine hydrolysaat en kipserum en indien serum niet was gewenst aan TC medium 199.

### 3.3. Virusvermenigvuldiging in HeLa-cellen

Proeven over de vermenigvuldiging van virus werden verricht in HeLa-cellen, die na het enten met virus op twee manieren werden geïnkubeerd, namelijk stationair en in een draaiende trommel, aangezien Amerikaanse onderzoekers (Mufson e.m., 1962) erop hebben gewezen, dat de wijze van inkubatie van betekenis is voor de ontwikkeling van het cytopathologische effect van Cocksackie A 21-virus.

HeLa-cellen werden gekweekt in flessen. Nadat zich een aaneengesloten cellaag had gevormd, werden de celkulturen van 2 flessen voorzien van 5 ml onderhoudsmedium per fles, waaraan een hoeveelheid virus was toegevoegd, die overeenkwam met ongeveer 1 TCID<sub>50</sub> per cel. Het onderhoudsmedium bestond uit 0,5% laktalbumine hydrolysaat in Hanks' oplossing en 2,5% kipserum. De cellen en het virus-inokulum werden gedurende 3 uren stationair bij 35° C geïnkubeerd. Vervolgens werd de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd en bewaard bij -20° C ter bepaling van virus, dat niet aan de cellen was geadsorbeerd. De cellen werden 3 maal gewassen met Hanks' gebufferde zoutoplossing. De derde wasvloeistof werd eveneens bewaard ter bepaling van het resterende virus. De celkweken werden voorzien van 10 ml onderhoudsmedium, waarna 1 fles stationair en 1 fles in een draaiende trommel bij 35° C werden geïnkubeerd.

Ter controle werden onbeënte flessen, die overigens dezelfde be-

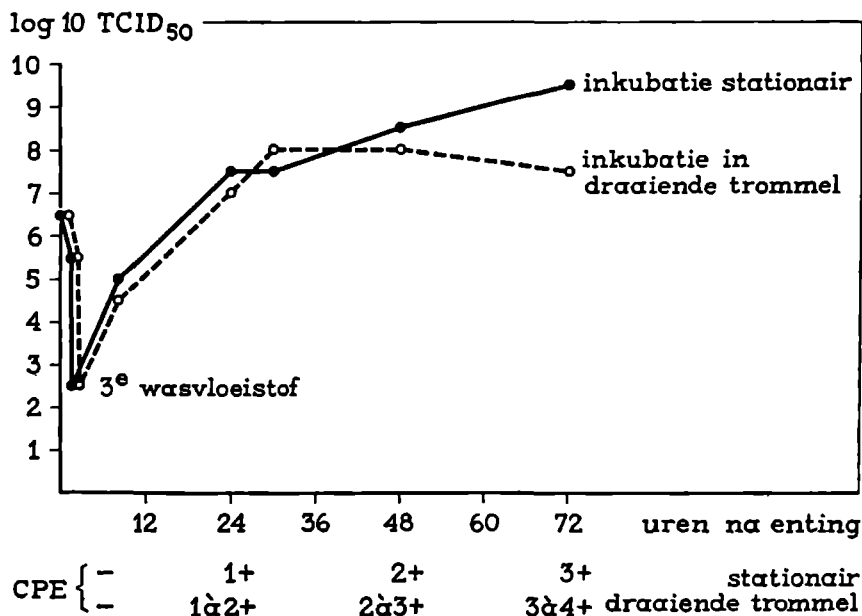


handeling hadden ondergaan, eveneens stationair en in een draaiende trommel geïnkubeerd.

Op verschillende tijdstippen na de enting (8, 24, 30, 48 en 72 uren) werd een monster van 0,5 ml van de bovenstaande vloeistof afgezogen en bij  $-20^{\circ}\text{C}$  bewaard. Tegelijkertijd werden de celkweken onderzocht op cytopathologische veranderingen. Nadat het laatste monster was verzameld, werd het resterende materiaal (cellen, celresten en resterende bovenstaande vloeistof) geoogst om de totale virusproductie te bepalen. Het resterende materiaal werd 3 maal bij  $-20^{\circ}\text{C}$  bevroren en bij kamertemperatuur ontdooid om virus, dat aan cellen was gebonden vrij te maken. De celresten werden verwijderd door gedurende 5 minuten op 3000 rpm te centrifugeren.

De monsters werden onderzocht door middel van titratie in HeLa-cellen. De titraties werden in één proef verricht. De uitkomsten zijn weergegeven in Figuur 1.

Fig. 1. Vermenigvuldiging van Cocksackie A 21-virus in HeLa-cellen



Het bleek, dat 3 uren na de enting 90% van het virus aan de cellen was geadsorbeerd. Zoals boven is aangegeven, werden de celkweken gedurende de adsorptie stationair geïnkubeerd. In de derde wasvloeistof werd 0,1% van het resterende, niet-geadsorbeerde virus aangetrof-

fen. Acht uren na de enting was reeds virusvermenigvuldiging aantoonbaar, terwijl er nog geen cytopathologisch effect was te zien. Na 24 uren was de maximale produktie van infektieus virus vrijwel bereikt en pas op dit moment werd cytopathologisch effect waarneembaar. De cytopathologische afwijkingen in de celkweek, die draaiend was geïnkubeerd, was steeds iets uitgebreider dan in de celkweek, die stationair werd geïnkubeerd. De virusvermenigvuldiging in beide celkweken verliep echter geheel parallel. Op de derde dag na enting was in het monster van de stationair geïnkubeerde kultuur meer virus aantoonbaar dan in het monster van de draaiende kultuur. De totale virusproduktie in beide kulturen was echter gelijk, indien in het resterende materiaal virus, dat aan cellen was gebonden en door bevroren en ontdooien was vrij gemaakt, mede werd bepaald. Het verschil in de monsters, die na 72 uren waren verzameld, is mogelijk een gevolg van adsorptie van virushoudende cellen aan de glaswand van de draaiende kultuur.

### 3.4. Vorming van hemagglutinenen in HeLa-cellen

Coxsackie A 21-virus heeft het vermogen menselijke O-erythrocyten bij 4° C te agglutineren (Johnson e.m., 1961; Schmidt e.m., 1962). Wij vonden, dat de door ons geïsoleerde virusstammen geen hemagglutinatie veroorzaakten. De meeste stammen waren gekweekt in HeLa-cellen. Johnson en medewerkers (1961) menen, dat het hemagglutinerende vermogen verloren zou kunnen gaan, indien het virus in cellijnen wordt gepasseerd (zie Hoofdstuk I, 1.4.1.). Het bleek echter dat ook virusstammen, die in ons laboratorium uitsluitend in kweken van vers foetaal nierweefsel waren geïsoleerd en gepasseerd, geen hemagglutinerend vermogen bezaten.

Met het oog hierop hebben wij een onderzoek verricht met een hemagglutinerende virusstam uit de Verenigde Staten (stam „Bouma”). De stam werd gekweekt in kulturen van vers schildklier- en foetaal nierweefsel van de mens. Het bleek, dat met deze stam hemagglutinenen konden worden verkregen in hoeveelheden van 64 tot 256 agglutinatien-eenheden (AE) per 0,4 ml. Er was geen verschil in opbrengst van hemagglutinenen tussen schildklier- en foetaal nierweefsel.

Aangezien verse weefsels niet altijd beschikbaar zijn, hebben wij een onderzoek ingesteld naar de vorming van hemagglutinenen door de stam „Bouma” in HeLa-cellen. Uit Amerikaanse onderzoeken (Johnson e.m., 1961) is het bekend, dat ook in cellijnen hemagglutinenen kunnen worden gevormd, echter in geringe hoeveelheden. Schmidt en medewerkers (1962) kregen een bevredigende produktie

van hemagglutinerend virus bij de kweek in cellijnen, indien zij een remmende faktor, die tijdens het kweken wordt gevormd, met fluorocarbon verwijderden.

De stam „Bouma” werd geënt in HeLa-cellen, die in flessen waren gekweekt. In een fles werd 1 ml van een onverdunde virussuspensie gebracht, die 64 agglutinatíe-eenheden (AE) per 0,4 ml bevatte. Het onderhoudsmedium bestond uit 0,5% laktalbumine hydrolysaat in Hanks' gebufferde zoutoplossing en 2,5% kipserum. De beënte flessen werden in een draaiende trommel bij 35° C geïnkubeerd. Na 3 dagen was meer dan 50% van de cellen door het virus aangetast. Op dit tijdstip is het materiaal geoogst door het 3 maal bij -20° C te bevriezen en bij kamertemperatuur te ontdooien. Vervolgens werd de suspensie in 3 porties verdeeld, die als volgt werden behandeld:

1. celresten werden door centrifugeren gedurende 5 minuten op 3000 rpm verwijderd;
2. de suspensie werd gedurende 2 minuten in een ijswaterbad aan ultrasonore trillingen blootgesteld, waarna het celdebris door centrifugeren gedurende 5 minuten op 3000 rpm werd verwijderd;
3. aan de suspensie werd een gelijke hoeveelheid fluorocarbon (Arcton) toegevoegd en vervolgens gedurende 2 minuten in een ijswaterbad aan ultrasonore trillingen blootgesteld; de waterige fase werd van de fluorocarbon gescheiden door 10 minuten te centrifugeren op 1500 rpm.

Tegelijkertijd werd hetzelfde inokulum in dezelfde hoeveelheid geënt in een kweek van vers foetaal nierweefsel, die werd aangehouden in TC medium 199, doch overigens op dezelfde wijze als de HeLa-cellen werd geïnkubeerd en geoogst. Het geoogste materiaal onderging geen verdere behandeling dan verwijdering van celresten door centrifugeren. Ter controle werd zowel van de HeLa- als van de foetale niercellen een fles, die niet met virus was beënt, op overeenkomstige wijze behandeld. De hemagglutinenen in de verschillende vloeistoffen werden bepaald zoals in Hoofdstuk II, 2.4.5., is beschreven. De resultaten van de hemagglutinatiereakties, zijn in Tabel 8 weergegeven.

Het blijkt, dat er in HeLa-cellen geen vermeerdering van hemagglutinenen heeft plaats gevonden. Zonder behandeling met fluorocarbon zijn geen hemagglutinenen aantoonbaar. Na behandeling met fluorocarbon wordt hemagglutinatíe waarneembaar, die echter niet groter is

Tabel 8. *Vorming van hemagglutinenen na enting van Cocksackie A 21-virus in foetaal nierweefsel en HeLa-cellen*

Behandeling	Hemagglutinenen (aantal AE/0,4 ml)			
	Cocksackie A 21-virus in		Onbeënte	
	Foetale niercellen	HeLa- cellen	Foetale niercellen	HeLa- cellen
5 min. centrifugeren op 3000 rpm	256	<2	<2	<2
Ultrasonore trilling zonder fluorocarbon	N.O. <sup>1)</sup>	<2	N.O.	<2
Ultrasonore trilling met fluorocarbon	N.O.	4	N.O.	<2

<sup>1)</sup> Niet onderzocht.

dan de hoeveelheid hemagglutinenen, die door enting is ingebracht. Uit deze proef bleek, dat de produktie van hemagglutinenen in de door ons gebruikte HeLa-celijn niet tot stand kwam en dat in overeenstemming met de waarneming van Schmidt en medewerkers (1962) een faktor in het kweekmedium aanwezig was, die de hemagglutinatatie verhinderde.

### 3.5. Hemagglutinatiereaktie en hemagglutinatieremmingsreaktie

3.5.1. *Invloed van de temperatuur op de hemagglutinatiereaktie.* Hemagglutinatiereakties met enterovirussen worden in de regel verricht bij 4° C. Het bleek, dat deze temperatuur optimaal was voor Cocksackie A 21-virus (Johnson e.m., 1961). Wij hebben een onderzoek verricht naar de invloed van de temperatuur op de hemagglutinatiereaktie alvorens de reaktie voor het verder onderzoek toe te passen.

De uitvoering van de hemagglutinatiereaktie geschiedde op de wijze, die in Hoofdstuk II, 2.4.5., is beschreven. Alleen de temperatuur van inkubatie en daarmee samenhangend de duur van de reaktie werden gevarieerd. De reaktie werd verricht bij 4°, kamertemperatuur en 36° C, en werd afgelezen na respectievelijk 120, 70 en 60 minuten. De uitkomsten zijn in Tabel 9 weergegeven.

Tabel 9. *Hemagglutinatiereactie van Cocksackie A 21-virus  
bij verschillende temperaturen*

Onderzocht materiaal	Hemagglutinatie (aantal AE/0,4 ml)		
	4° C	± 22° C	36° C
Cocksackie A 21-virus	160	40	< 10
Vloeistof van onbeënte cellen	< 10	< 10	< 10

In overeenstemming met de bevindingen van andere onderzoekers blijkt de optimale temperatuur voor de hemagglutinatiereactie bij 4° C te liggen.

3.5.2. *Invloed van de virusconcentratie op de hemagglutinatieremmingsreactie.* De uitkomsten van hemagglutinatieremmingsreacties zijn in het algemeen afhankelijk van de gebruikte hoeveelheid virus. Om na te gaan of dit ook geldt voor de reactie met Cocksackie A 21-virus, hebben wij proeven verricht met verschillende concentraties virus. Een antiserum tegen Cocksackie A 21-virus, dat bij een cavia was bereid, werd onderzocht met 1, 2, 4 en 8 agglutinatie-eenheden (AE) virus per 0,2 ml. De uitkomsten van de reacties zijn weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10. *Hemagglutinatieremmingsreactie van een antiserum met verschillende concentraties Cocksackie A 21-virus*

Stam „Bouma” (AE/0,2 ml)	Hemagglutinatieremmende antistoftiter van antiserum van een cavia
1	25.600
2	12.800
4	9.600
8	4.800

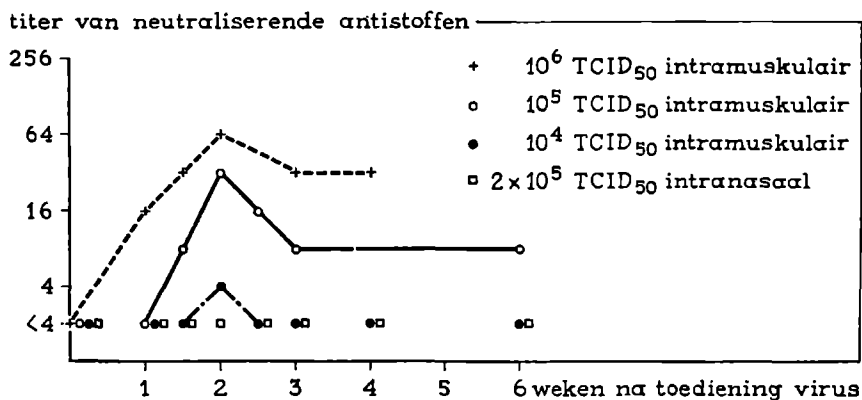
Het blijkt, dat — overeenkomstig de verwachting — de titer van het serum lager wordt met de toeneming van de hoeveelheid virus. Voor het verdere onderzoek met de hemagglutinatieremmingsreactie werden slechts de resultaten van die proeven geaccepteerd, indien virusconcentraties van 3 tot 6 agglutinatie-eenheden waren gebruikt.

### 3.6. Ontwikkeling van antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus bij caviae

3.6.1. *Ontwikkeling van neutraliserende antistoffen.* Voor de proeven werd gebruik gemaakt van caviae met een gewicht van 200-300 gram. Het virus (stam V58-5178), dat aan de dieren werd toegediend, was gekweekt in HeLa-cellen. De virussuspensie werd ontdaan van grove celresten door gedurende 10 minuten op 3000 rpm te centrifugeren. De bovenstaande vloeistof bevatte  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> per ml.

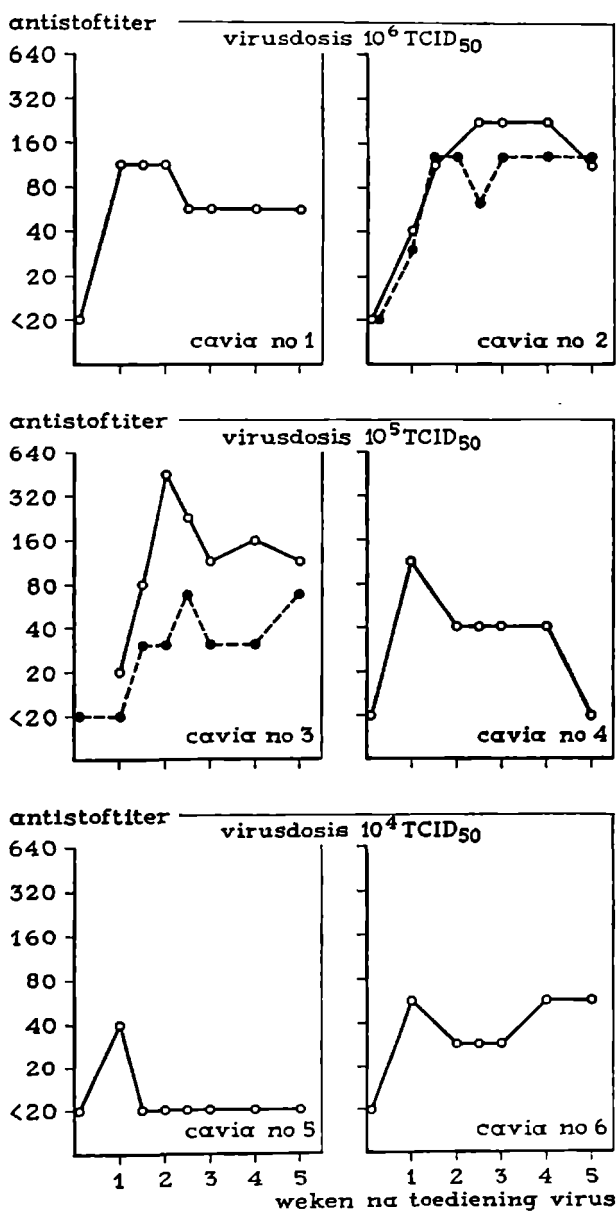
Drie caviae, die onder een lichte ethernarkose waren gebracht, werden intranasaal besmet door 0,1 ml van de onverdunde virussuspensie in elk neusgat te druppelen. Dezelfde virussuspensie werd gelijktijdig bij 3 andere caviae intramuskulair ingespoten in doseringen van respectievelijk  $10^{6.0}$ ,  $10^{5.0}$  en  $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub>. Er werd aan elk dier slechts één maal virus toegediend. Van elke cavia werd voor de toediening van het virus en 1, 1½, 2, 2½, 3, 4 en 6 weken erna bloed afgenomen. Ieder monster bloed werd onderzocht op neutraliserende antistoffen. Sera van één cavia werden steeds in dezelfde proef onderzocht. De uitkomsten van de proeven zijn weergegeven in Fig. 2.

Fig. 2. *Ontwikkeling van neutraliserende antistoffen bij caviae na intranasale en intramuskulaire toediening van Coxsackie A 21-virus*



Het blijkt, dat intranasale besmetting niet leidde tot ontwikkeling van aantoonbare neutraliserende antistoffen. Daarentegen werden wel antistoffen gevormd na intramuskulaire toediening van dezelfde hoeveelheid virus. Bij intramuskulaire toediening van het virus bleek er een duidelijk verband te bestaan tussen de hoeveelheid toegediend virus

Fig. 3. Ontwikkeling van hemagglutinatieremmende en neutraliserende antistoffen bij caviae na intramusculaire toediening van Coxsackie A 21-virus



○—○hemagglutinatieremmende antistoffen  
●—●neutraliserende antistoffen

enerzijds en het tijdstip, waarop voor het eerst antistoffen aantoonbaar waren en de hoogte van de antistoftiter anderzijds.

Uit dit onderzoek blijkt, dat caviae, die een hoge dosis infectieus virus intranasaal hebben ontvangen, niet worden geïnfecteerd. De ontwikkeling van antistoffen, die duidelijk afhankelijk blijkt van de hoeveelheid toegediend virus, maakt het niet waarschijnlijk dat vermeerdering van virus bij caviae optreedt.

3.6.2. *Ontwikkeling van hemagglutinatieremmende antistoffen.* Voor de proeven werd gebruik gemaakt van caviae met een gewicht van 350-500 gram. De dieren werden intramuskulair ingespoten met een dosis van respectievelijk  $10^{6.0}$ ,  $10^{5.0}$  en  $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub> virus (stam V58-5178). Iedere dosis werd toegediend aan elk van 2 dieren. Van elke cavia werd vóór de toediening van het virus en 1, 1½, 2, 2½, 3, 4 en 5 weken erna bloed afgenomen. Ieder monster bloed werd onderzocht op hemagglutinatieremmende antistoffen tegen de stam „Bouma”, No. 48560. Ter controle werden sera van 2 caviae tevens onderzocht op neutraliserende antistoffen tegen de homologe virusstam V58-5178. Sera van één cavia werden steeds in dezelfde proef onderzocht. De uitkomsten zijn weergegeven in Fig. 3.

Het blijkt, dat er — evenals bij het onderzoek op de vorming van neutraliserende antistoffen — een verband bestaat tussen de hoeveelheid toegediend virus en de ontwikkeling van hemagglutinatieremmende antistoffen. Na toediening van  $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub> virus werden duidelijk lagere titers gevonden dan na toediening van  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> virus. De uitkomsten van het onderzoek op neutraliserende antistoffen bij cavia nummer 2 en 3 laten zien, dat de ontwikkeling van hemagglutinatieremmende en neutraliserende antistoffen ongeveer parallel verloopt.



## ONDERZOEK VAN ENKELE METHODEN OM INFEKTIES MET COXSACKIE A 21-VIRUS AAN TE TONEN

Met het oog op de diagnostiek van infecties met Coxsackie A 21-virus hebben wij vervolgens een onderzoek ingesteld naar de gevoeligheid van enkele celkweken voor de isolatie van virus uit materiaal van patiënten. Verder hebben wij een onderzoek verricht naar de gevoeligheid van enkele serologische reacties, die kunnen worden toegepast om de ontwikkeling van antistoffen bij patiënten aan te tonen.

### 4.1. Overzicht van de uitkomsten van virologische en serologische onderzoeken op Coxsackie A 21-virus bij 83 patiënten

In de periode oktober-november 1961 werden in de legerplaats Ossendrecht 105 patiënten wegens akute infectie van de luchtwegen op de ziekenzaal opgenomen. Van 83 patiënten werden keelsekreet en bloed verkregen, zodat bij elk van deze patiënten virologisch en serologisch onderzoek kon worden verricht. Het bloed was afgenomen tijdens de akute fase van de ziekte en 10-14 dagen later. Het onderzoek op influenza- en adenovirus bij deze patiënten was negatief. Sera van één patiënt werden in dezelfde proef onderzocht. Een 4-voudige of grotere titerstijging van antistoffen werd als significant beschouwd.

Bij 24 patiënten (29%) werd Coxsackie A 21-virus geïsoleerd. Het serologische onderzoek was bij 34 patiënten (41%) positief. Infectie met Coxsackie A 21-virus werd virologisch en/of serologisch vastgesteld bij 40 patiënten (48%). Een overzicht van de resultaten van onderzoeken bij de 40 patiënten, bij wie één of meer onderzoeksmethoden positieve bevindingen hebben opgeleverd, is in Tabel 11 weergegeven.

### 4.2. Isolatie van Coxsackie A 21-virus in verschillende celkweken

Wij hebben voor de isolatieproeven gebruik gemaakt van 3 soorten celkweken: HeLa-cellen, verse kweken van schildklierweefsel en verse kweken van foetaal nierweefsel (zie Hoofdstuk II, 2.1.). De wijze, waarop keelsekreet werd geënt, is in Hoofdstuk II, 2.3. beschreven. Het

Tabel 11. *Gegevens van 40 patiënten, bij wie het virologische en/of serologische onderzoek op Coxsackie A 21-virus positief is uitgevallen*

No. patiënt	Isolatie van Coxsackie A 21-virus	Titers van antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus					
		Neutraliserende antistoffen		Hemagglutinatieremmende antistoffen		Komplementbindende antistoffen	
		Akute fase	Rekonv.	Akute fase	Rekonv.	Akute fase	Rekonv.
1	Pos.	< 4	8	20	80	20	≥ 80
2	Pos.	< 4	8	60	320	20	≥ 80
3	Pos.	< 4	16	< 20	40	10	≥ 80
4	Pos.	< 4	16	< 20	80	10	≥ 80
5	Pos.	< 4	16	< 20	120	40	160
6	Pos.	< 4	64	< 20	480	5	80
7	Pos.	< 4	≥ 256	< 20	5120	20	80
8	Pos.	< 4	8	< 20	240	160	320
9	Pos.	< 4	32	< 20	40	20	20
10	Pos.	< 4	32	< 20	40	40	80
11	Pos.	< 4	≥ 256	< 20	960	80	80
12	Pos.	8	≥ 256	60	960	20	40
13	Pos.	< 4	8	20	20	20	640
14	Pos.	< 4	8	< 20	< 20	40	40
15	Pos.	32	128	30	60	40	40
16	Pos.	32	16	30	480	160	320
17	Pos.	< 4	4	< 20	< 20	10	≥ 80
18	Pos.	< 4	< 4	< 20	20	20	160
19	Pos.	< 4	< 4	< 20	< 20	40	40
20	Pos.	< 4	< 4	20	20	10	10

No. patiënt	Isolatie van Coxsackie A 21-virus	Titers van antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus					
		Neutraliserende antistoffen		Hemagglutinatie- remmende antistoffen		Komplement- bindende antistoffen	
		Akute fase	Rekonv.	Akute fase	Rekonv.	Akute fase	Rekonv.
21	Pos.	8	8	160	120	10	10
22	Pos.	16	16	160	120	40	40
23	Pos.	32	64	30	80	40	40
24	Pos.	32	64	3840	1280	40	40
25	Neg.	< 4	8	< 20	60	10	160
26	Neg.	< 4	8	20	160	20	160
27	Neg.	< 4	64	20	1280	10	160
28	Neg.	< 4	16	< 20	80	80	40
29	Neg.	< 4	16	30	120	20	40
30	Neg.	< 4	16	240	160	20	20
31	Neg.	8	32	30	30	10	10
32	Neg.	8	128	60	80	20	20
33	Neg.	16	128	160	320	20	20
34	Neg.	32	128	160	160	10	10
35	Neg.	4	4	< 20	40	10	10
36	Neg.	4	4	< 20	240	20	20
37	Neg.	< 4	< 4	20	80	80	80
38	Neg.	< 4	4	20	160	80	80
39	Neg.	< 4	< 4	40	160	10	10
40	Neg.	< 4	< 4	40	160	40	20

onderzoek werd verricht bij patiënten, van wie materiaal was afgenomen voor virologisch en serologisch onderzoek (4.1.). Keelsekreet van 23 van de 83 patiënten was gelijktijdig in 2 soorten cellen (HeLa-cellen en een verse kweek van schildklier- of foetaal nierweefsel) geënt; alleen deze gevallen werden in een vergelijkend onderzoek betrokken. Het aantal monsters keelsekreet, dat gelijktijdig in 3 soorten cellen was geënt, was te klein voor een vergelijkend onderzoek; deze gevallen werden buiten beschouwing gelaten. De resultaten van de isolatieproeven in 2 soorten cellen zijn in Tabel 12 weergegeven.

Tabel 12. *Isolatie van Cocksackie A 21-virus uit de keel van patiënten in HeLa-, schildklier- en foetale niercellen*

Aantal onderzochte patiënten	Aantal positieve isolaties			Totale aantal positieve patiënten
	HeLa-cellen	Schildklier-cellen	Foetale niercellen	
9	1	5	N.O. <sup>1)</sup>	5
14	4	N.O.	4	6

<sup>1)</sup> Niet onderzocht.

Uit Tabel 12 zou kunnen worden opgemaakt, dat schildkliercellen gevoeliger zijn voor de isolatie van Cocksackie A 21-virus dan HeLa-cellen. Bij 5 van de 9 patiënten, van wie het keelsekreet gelijktijdig in HeLa- en in schildkliercellen was geënt, werd een overeenkomstig resultaat verkregen, namelijk beide kweken positief of beide kweken negatief. In de overige 4 gevallen, waarbij geen gelijkluidende uitkomsten werden verkregen, bleek steeds de kweek in schildkliercellen positief en die in HeLa-cellen negatief te zijn uitgevallen. Het aantal ongelijke uitkomsten is te gering om tot een statistische uitspraak te komen omtrent een eventueel verschil in gevoeligheid tussen de beide celsoorten.

Keelsekreten, die gelijktijdig in HeLa- en foetale niercellen waren geënt, gaven in 10 van de 14 gevallen een overeenkomstig resultaat. In 4 gevallen werden geen gelijkluidende uitkomsten verkregen. De verdeling van de positieve kweken was echter gelijk, namelijk 2 keelsekreten waren alleen in HeLa-cellen en 2 keelsekreten alleen in foetale niercellen positief. In deze vergelijking werd geen verschil in gevoeligheid van HeLa- en foetale niercellen waargenomen.

Zoals hierboven is vermeld (Tabel 12) werd keelsekreet van 23

van de 83 virologisch onderzochte patiënten gelijktijdig in HeLa-cellen en in een verse celkweek geënt. Keelsekreet van de overige 60 patiënten werd eerst alleen in HeLa-cellen geënt. In 52 gevallen werd het sekreet bovendien op een later tijdstip in verse kweken van schildklier- en foetale niercellen onderzocht. De keelsekreten, die op een later tijdstip opnieuw werden geënt, zijn bij -50° C bewaard. In Tabel 13 zijn de resultaten van de positieve isolaties in de 3 celsoorten weergegeven.

Tabel 13. *Positieve isolaties van Coxsackie A 21-virus in HeLa-, schildklier- en foetale niercellen*

Onderzocht in:	Aantal positieve keel-sekreten	Positieve isolaties in:				
		HeLa-en schildklier-cellen	HeLa-en foetale nier-cellen	HeLa-cellen	Schildklier-cellen	Foetale nier-cellen
1 celsoort	6	—	—	6	—	—
2 celsoorten	11	1	2	2	4	2
3 celsoorten	7	4	0	1	2	0
Totaal	24	5	2	9	6	2

Uit Tabel 13 blijkt, dat de kweekproeven in HeLa-cellen in 16 gevallen positief waren. Wanneer bovendien verse kweken van menselijke weefsels werden gebruikt, steeg het aantal positieve gevallen tot 24. Uit deze resultaten mag niet worden afgeleid, dat verse celkweken gevoeliger zijn voor de isolatie van Coxsackie A 21-virus dan HeLa-cellen. Het is heel goed mogelijk dat het grotere aantal virusisolaties bij kweekproeven in twee of drie celsoorten berust op het grotere volumen keelsekreet, dat in dit geval wordt geënt. Het is denkbaar, dat dezelfde resultaten zouden zijn verkregen, indien het sekreet voor een tweede of derde maal opnieuw in HeLa-cellen was geënt.

#### 4.3. Vergelijking van enkele serologische reacties op antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus

Voor het onderzoek op antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus hebben wij gebruik gemaakt van 3 serologische reacties: de neutralisatie-,

hemagglutinatieremmings- en komplementbindingsreactie (zie Hoofdstuk II, 2.4.3., 2.4.4. en 2.4.5.). Het onderzoek werd verricht bij de 83 patiënten, die eveneens virologisch waren onderzocht (4.1.).

De uitkomsten zijn samengevat in Tabel 14. In deze tabel is een onderverdeling gemaakt op grond van positieve of negatieve isolatieproeven en op grond van aan- of afwezigheid van antistoffen in het bloed tijdens de akute fase van de ziekte.

Uit Tabel 14 blijkt, dat zowel een aantal patiënten, bij wie Cox-sackie A 21-virus was afgezonderd, als enkele patiënten, bij wie geen virus was gevonden, neutraliserende antistoffen ontwikkelden. Bij de eerstgenoemde patiënten werden echter relatief vaker titerstijgingen gevonden dan bij de laatstgenoemde patiënten, respectievelijk bij 15 van 24 en 10 van 59 patiënten. Vergelijking van de uitkomsten binnen de groep patiënten, die antistoffen toonden in de akute fase van de ziekte en van die binnen de groep, die géén antistoffen hadden, gaf, na combinatie van de toetsingsuitkomsten, een significant verschil te zien ( $P_{2z} = 0,01$ , kombinatietoets voor  $2 \times 2$ -tabellen). Ontwikkeling van hemagglutinatieremmende antistoffen kwam eveneens significant vaker voor bij patiënten, bij wie virus was afgezonderd, dan bij virologisch negatieve patiënten ( $P_{2z} = 0,02$ ). Hetzelfde werd waargenomen voor de ontwikkeling van komplementbindende antistoffen bij patiënten met antistoffen in de akute fase van de ziekte ( $P_{2z} = 0,0002$ , exakt berekend). Het verband tussen ontwikkeling van antistoffen en isolatie van virus vormt een aanwijzing voor de specificiteit van de serologische reacties bij de door ons onderzochte patiënten.

Uit Tabel 14 blijkt verder, dat er een verband bestaat tussen aanwezigheid van antistoffen in de akute fase van de ziekte en isolatie van virus. Virus werd geïsoleerd bij 17 (53%) van 32 patiënten, bij wie in het eerste serum geen neutraliserende antistoffen waren aangetroffen, en bij 7 (14%) van 51 patiënten, bij wie wel neutraliserende antistoffen waren gevonden; dit verschil is significant ( $P = 0,0003$ ,  $\chi^2$ -toets). Voor hemagglutinatieremmende antistoffen waren dit er respectievelijk 13 (52%) van 25 en 11 (19%) van 58 patiënten; ook dit verschil is significant ( $P = 0,005$ ). Wanneer isolatie van virus wordt beschouwd als criterium voor infectie, dan mag op grond van deze bevindingen worden aangenomen, dat er verband bestaat tussen afwezigheid van antistoffen en vóórkomen van infectie; aanwezigheid van neutraliserende en hemagglutinatieremmende antistoffen tegen Cox-sackie A 21-virus zou wijzen op bescherming tegen infectie met dit virus.

Tabel 14. *Vergelijking van de neutralisatie-, hemagglutineremmings- en komplementbindingsreactie voor het aantonen van antistoffen bij 24 patiënten, bij wie Cocksackie A 21-virus was afgezonderd en bij 59 patiënten, bij wie géén virus was afgezonderd*

Serologische reactie	Patiënten, bij wie Coxsackie A 21-virus was afgezonderd			Patiënten, bij wie géén virus was afgezonderd			
	Aantal patiën- ten	Signifi- kante titer- stijging	Géén titer- stijging	Aantal patiën- ten	Signifi- kante titer- stijging	Géén titer- stijging	
Neutralisatie- reactie							
Titer van antistoffen in de akute fase van de ziekte	$\geq 4$	7	2	5	44	4	40
	$< 4$	17	13	4	15	6	9
Totaal		24	15	9	59	10	49
Hemagglutinatie- remmingsreactie							
Titer van antistoffen in de akute fase van de ziekte	$\geq 20$	11	4	7	47	7	40
	$< 20$	13	9	4	12	4	8
Totaal		24	13	11	59	11	48
Komplementbindings- reactie							
Titer van antistoffen in de akute fase van de ziekte	$\geq 5$	24	10	14	55	3	52
	$< 5$	0	0	0	4	0	4
Totaal		24	10	14	59	3	56

Er kon geen verband worden aangetoond tussen aanwezigheid van komplementbindende antistoffen in de akute fase van de ziekte en isolatie van virus ( $P_{22} = 0,32$ , exakt berekend). Bij alle 24 patiënten, bij wie virus werd afgezonderd, werden in het eerste serum komplementbindende antistoffen gevonden. Het is niet waarschijnlijk, dat deze positieve reacties berustten op een reactie van serum met gastheercomponenten in het antigeen. Proeven met vloeistof van niet beënte celkweken, die overigens op dezelfde wijze waren behandeld als de beënte celkweken, waren steeds negatief. Het is mogelijk, dat de positieve reacties berustten op de aanwezigheid van antistoffen, die zijn opgewekt door in het verleden doorgemaakte infecties met Cocksackie- of picornavirussen, die verwant zijn aan Cocksackie A 21-virus.

Op grond van de voorgaande waarnemingen, dat er enerzijds een duidelijk positief verband bestaat tussen de ontwikkeling van antistoffen en isolatie van virus en dat er anderzijds een duidelijk verband bestaat tussen de afwezigheid van antistoffen in de akute fase van de ziekte en isolatie van het virus, moet logischerwijze worden verwacht, dat er een verband bestaat tussen de aanwezigheid van neutraliserende of hemagglutineremmende antistoffen in de akute fase van de ziekte en ontwikkeling van deze antistoffen tijdens de ziekte. Dit laatste verband kan eveneens uit Tabel 14 worden waargenomen. Een significante titerstijging van neutraliserende antistoffen werd vastgesteld bij 19 (59%) van 32 patiënten, bij wie in het eerste serum geen neutraliserende antistoffen waren aangetroffen, en bij 6 (12%) van 51 patiënten, bij wie wel neutraliserende antistoffen waren gevonden. Vergelijking van de resultaten gevonden binnen de groep patiënten, bij wie virus was afgezonderd en van die binnen de groep patiënten, bij wie dit niet het geval was en combinatie van de uitkomsten, bracht een duidelijk significant verschil aan het licht ( $P_{22} = 0,002$ , kombinatietoets voor  $2 \times 2$ -tabellen). Voor hemagglutineremmende antistoffen bedroegen deze aantallen respectievelijk 13 (52%) van 25 en 11 (19%) van 58 patiënten. Dit verschil kwam na combinatie van de uitkomsten eveneens duidelijk naar voren ( $P_{22} = 0,04$ ). Ook deze bevindingen vormen een steun voor de opvatting, dat aanwezigheid van neutraliserende of hemagglutineremmende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus zou wijzen op bescherming tegen infectie met dit virus. Er kon geen verband worden aangetoond tussen aanwezigheid van komplementbindende antistoffen in de akute fase van de ziekte en ontwikkeling van antistoffen tijdens de ziekte bij patiënten, bij wie géén virus was afgezonderd ( $P > 0,95$ , exakt berekend). Bij alle patiënten, bij wie een titerstijging



van komplementbindende antistoffen was vastgesteld, werden in het eerste serum komplementbindende antistoffen gevonden.

### Beschouwing:

Bij 40 van 83 patiënten, die in de periode oktober-november 1961 waren opgenomen wegens een akute aandoening van de luchtwegen en die volledig virologisch en serologisch waren onderzocht, was het onderzoek op Coxsackie A 21-virus (enterovirus 24) positief. Bij 24 (29%) van de 83 patiënten werd virus geïsoleerd. Johnson en medewerkers (1962) isoleerden Coxsackie A 21-virus bij 116 (50%) van 230 door hen onderzochte patiënten. Bij 64 van deze patiënten ging de aandoening van de luchtwegen gepaard met een temperatuursverhoging en het virus werd in deze gevallen bij 34 (53%) patiënten geïsoleerd. McDonald en medewerkers (1962) isoleerden het virus bij 48 (4%) van 1129 patiënten. De resultaten van deze onderzoeken zijn echter niet vergelijkbaar met die van ons onderzoek, daar wij slechts gedurende een beperkte periode van een epidemie onderzoek hebben gedaan. De resultaten van de isolatieproeven, die door Johnson en medewerkers zijn verricht, zijn zeer goed. In het midden van de epidemie werd bij 17 (85%) van 20 patiënten virus geïsoleerd, aan het begin en einde van de epidemie bij respectievelijk 8 (50%) van 16 patiënten en 9 (32%) van 28 patiënten. De patiënten, die door ons zijn onderzocht, stammen uit het einde van een epidemie (zie Hoofdstuk V). Wanneer wij onze resultaten (29%) vergelijken met de bevindingen van Johnson en medewerkers tijdens het einde van de epidemie (32%), dan stemmen de uitkomsten goed met elkaar overeen.

Tijdens het onderzoek van McDonald en medewerkers werd veel minder vaak virus geïsoleerd. Het onderzoek werd gedaan gedurende een periode van 5 maanden, namelijk van november 1958 tot en met maart 1959. Doch ook in de periode november-december 1958, waarin naar verhouding de meeste infecties met Coxsackie A 21-virus voorkwamen, werd slechts bij 32 (10%) van 300 patiënten virus geïsoleerd. Het verschil met onze resultaten is misschien een gevolg van een geringere cirkulatie van Coxsackie A 21-virus in de door hun onderzochte populatie. Er is echter ook een verschil in de methode van onderzoek. Zij hebben voor isolatieproeven gebruik gemaakt van HeLa-cellen en van verse kweken van apeniercellen. Uit de literatuur is het echter bekend, dat Coxsackie A 21-virus geen cytopathologische veranderingen teweeg brengt in verse kweken van apeniercellen (Lennette e.m., 1958; Pereira e.m., 1959). Voor de isolatie van Coxsackie A 21-virus waren dus in

feite alleen HeLa-cellen beschikbaar. In ons onderzoek werd Coxsackie A 21-virus bij 16 (19%) van 83 patiënten in HeLa-cellen afgezonderd. Wanneer bovendien verse kweken van schildklier- en foetale niercellen werden gebruikt, steeg het aantal positieve gevallen tot 24 (29%). Het is mogelijk, dat het gebruik van verschillende celkweken van weefsels, die van de mens afkomstig zijn, de isolatie van Coxsackie A 21-virus gunstig beïnvloedt.

Bij 34 (41%) van 83 patiënten werd een significante titerstijging van antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus vastgesteld. Het is niet geoorloofd om aan te nemen, dat ontwikkeling van antistoffen bij patiënten, bij wie geen virus werd geïsoleerd, in alle gevallen berustte op infectie met Coxsackie A 21-virus, aangezien heterotypische reacties ten gevolge van infecties met een aan Coxsackie A 21-virus verwant virus kunnen voorkomen. Daarentegen lijkt het wel verantwoord om aan te nemen, dat een stijging van de antistoftiter bij patiënten, bij wie wel virus was geïsoleerd, het gevolg was van infectie met Coxsackie A 21-virus. Daar de gevoeligheid van de verschillende serologische reacties voor het aantonen van infecties niet strikt met elkaar zijn te vergelijken zullen we ons beperken tot een schatting van de doelmatigheid van deze reacties bij de laatstgenoemde groep patiënten. In totaal werd bij 18 (75%) van de 24 virologisch positieve patiënten door middel van één of meer serologische reacties een stijging van de antistoftiter aangetoond. Het serologische onderzoek liet dus in 25% van de gevallen in de steek. Wanneer alleen de komplementbindingsreactie zou zijn toegepast, zou het onderzoek in 14 (58%) van de 24 gevallen negatief zijn uitgevallen. Bij toepassing van de neutralisatie- of hemagglutineringsremmingsreactie als enige serologische reactie zou het onderzoek in respectievelijk 37% en 46% van de gevallen gefaald hebben. Deze gegevens wijzen erop, dat de gevoeligheid van het serologische onderzoek om infecties met Coxsackie A 21-virus aan te tonen groter wordt, indien er verschillende serologische reacties naast elkaar worden toegepast.

Uit de literatuur (zie Hoofdstuk I, 2.3.2.) is gebleken, dat er na infectie of immunisatie met enterovirussen vaak heterotypische komplementbindende antistoffen worden gevormd. Heterotypische reacties kunnen optreden met typen uit dezelfde enterovirus-groep (Beeman e.m., 1952; Kraft e.m., 1952) of met typen uit verschillende enterovirus-groepen (Goetz, 1958; Hammon e.m., 1958; Johnsson e.m., 1958; Neva e.m., 1959; Lennette e.m., 1961; Mietens e.m., 1964; Kamitsuka e.m., 1965). In ons onderzoek werd een duidelijk verband waargenomen tussen ontwikkeling van komplementbindende antistoffen en isolatie van

virus. Bij 10 (42%) van 24 patiënten, bij wie Coxsackie A 21-virus was afgezonderd, werd een significante titerstijging van komplementbindende antistoffen vastgesteld, daarentegen slechts bij 3 (5%) van 59 patiënten, bij wie geen virus was gevonden. Bovendien werden door de 3 laatstgenoemde patiënten (zie Tabel 11, nr. 25, 26 en 27) tevens neutraliserende en hemagglutinatieremmende antistoffen gevormd. Op grond van deze waarnemingen is het waarschijnlijk, dat de ontwikkeling van komplementbindende antistoffen bij de door ons onderzochte patiënten niet berustte op een heterotypische reactie, maar het gevolg was van een infectie met Coxsackie A 21-virus.

Het is van poliomyelitisvirus bekend, dat met het complete, infectieuze viruspartikel, zgn. N-antigeen, type-specifieke komplementbindende antistoffen zijn aan te tonen, terwijl met het gedensureerde virus, zgn. D-antigeen, groep-specifieke antistoffen kunnen worden aangetoond. Denaturatie kan plaats vinden door verhitting, bestraling met ultra-violet licht, lyofiliseren of aanwezigheid van kwikverbindingen, fenol of een alkalisch milieu (Le Bouvier, 1959). Aangezien in voorproeven geen verschil werd waargenomen in de komplementbindende activiteit van onverhit en verhit Coxsackie A 21-virus hebben wij uit veiligheidsoverweging het geïnactiveerde antigeen gebruikt (zie Hoofdstuk II, 2.4.4.). Indien de waarnemingen van poliomyelitisvirus ook van toepassing zijn voor andere picornavirussen, dan is het mogelijk, dat met de komplementbindingsreactie, die wij hebben toegepast, hoofdzakelijk of alleen groep-specifieke antistoffen zijn aangetoond, die door verschillende typen Coxsackie-virussen en misschien andere picornavirussen kunnen worden opgewekt. De uitkomsten van de serologische reacties met sera uit de akute fase van de ziekte steunen deze veronderstelling. Bij alle patiënten, bij wie door middel van virologisch onderzoek een infectie met Coxsackie A 21-virus was vastgesteld, werden in het eerste serum komplementbindende antistoffen aangetroffen; daarentegen werden slechts bij 7 van de 24 patiënten neutraliserende antistoffen gevonden en bij 11 hemagglutinatieremmende antistoffen. Deze bevindingen en de gegevens uit de literatuur betreffende andere enterovirussen wijzen erop, dat de komplementbindingsreactie slechts een beperkte betekenis heeft voor het opsporen van infecties met Coxsackie A 21-virus.

Het is niet mogelijk om op grond van een vergelijking van de uitkomsten van het virologische en serologische onderzoek de gevoeligheid van de virusisolatieproeven voor het aantonen van een infectie met Coxsackie A 21-virus in een getal uit te drukken, omdat het niet vaststaat, dat alle patiënten, die antistoffen hebben ontwikkeld, maar bij wie

geen virus werd aangetroffen, door Coxsackie A 21-virus werden geïnfecteerd. Het is echter wel mogelijk om de minimale gevoeligheid aan te geven. Wanneer we aannemen, dat alle patiënten, bij wie een titerstijging van antistoffen is vastgesteld, met Coxsackie A 21-virus zijn geïnfecteerd, dan heeft het virologische onderzoek in 18 (53%) van de 34 gevallen een positief resultaat opgeleverd en liet het in 47% van de gevallen in de steek.

EPIDEMIOLOGISCH ONDERZOEK NAAR INFEKTIES  
MET COXSACKIE A 21-VIRUS

In 1958 werd in Ossendrecht bij 3 rekruten met een akute aandoening van de luchtwegen een infectie met Cocksackie A 21-virus (enterovirus 24) vastgesteld (van der Veen e.m., 1960). Deze waarneming en mededelingen uit andere landen (Lennette e.m., 1958; Pereira e.m., 1959; Fukumi e.m., 1961; Johnson e.m., 1962; Kjersgaard e.m., 1962; McDonald e.m., 1962) waren aanleiding een nader onderzoek te verrichten naar de verspreiding van Cocksackie A 21-virus onder militairen. Gegevens over de personen, die bij het onderzoek zijn betrokken, zijn vermeld in Hoofdstuk II, 2.5.

Aangezien virusinfecties van de luchtwegen niet alleen bij rekruten, maar ook op jeugdige leeftijd frekwent voorkomen, leek het ons van belang tevens een onderzoek in te stellen naar de mogelijke betekenis van Cocksackie A 21-virus als verwekker van akute respiratoire aandoeningen bij kinderen.

## 5.1. Frekwentie van infecties met Cocksackie A 21-virus onder rekruten

Om een indruk te verkrijgen over het voorkomen van infecties met Cocksackie A 21-virus, inklusief infecties, die niet gepaard gaan met ziekteverschijnselen, werd serologisch onderzoek verricht bij willekeurig gekozen rekruten. Direkt na opkomst in dienst en in de achtste oefenweek (kort voor de voltooiing van de basis-opleiding) werd bij hen bloed afgenomen. De sera werden onderzocht op neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus. Sera van één persoon werden steeds in dezelfde proef onderzocht. Eerst werd een onderzoek gedaan met 1 op 4 verdund serum. Indien in het tweede serum neutraliserende antistoffen aantoonbaar waren, werden beide sera van de betreffende rekrut kwantitatief (in verschillende verdunningen) onderzocht. Wij hebben aangenomen, dat rekruten, bij wie een 4-voudige of grotere titerstijging werd vastgesteld, met Cocksackie A 21-virus waren geïnfekteerd. De infecties gingen in de regel niet gepaard met ziekteverschijnselen, of de ziekteverschijnselen waren zo mild, dat de patiënt niet behoefde te worden opgenomen op de ziekenzaal. De uitkomsten van de proeven

zijn weergegeven in Tabel 15 en 16. In Tabel 15 is aangegeven het aantal rekruten, bij wie direct na opkomst in dienst neutraliserende antistoffen zijn gevonden; 7 groepen rekruten, die tussen oktober 1960 en januari 1962 waren opgekomen, werden onderzocht. In Tabel 16 vindt men de frekwentie van door middel van de neutralisatiereactie vastgestelde infecties met Coxsackie A 21-virus bij 4 groepen rekruten gedurende de basis-opleiding. In deze tabel is een onderverdeling gemaakt op grond van de aan- of afwezigheid van antistoffen in het serum bij opkomst in dienst.

Tabel 15. *Aanwezigheid van neutraliserende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus bij rekruten direct na opkomst in dienst*

Maand van opkomst in dienst	Aantal onder- zochte sera	Sera met neutraliserende antistoffen <sup>1)</sup>	
		Aantal	Percentage
1960, oktober	81	15	19
1961, februari	50	11	22
april	49	11	22
juni	50	9	18
augustus	137	30	22
oktober	150	37	25
december	100	48	48

<sup>1)</sup> Antistoffen aantoonbaar in 1 op 4 verdund serum.

Uit Tabel 15 blijkt, dat er, over de gehele waarnemingsperiode beschouwd, geen voldoende overeenstemming was in het percentage rekruten, dat bij opkomst in dienst neutraliserende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus bezat ( $P = 0,00003$ ,  $\chi^2$ -toets). Nadere beschouwing van de waarnemingsuitkomsten laat zien, dat de percentages in het tijdvak van oktober 1960 tot en met oktober 1961 onderling geen verschillen van betekenis tonen ( $P = 0,90$ ). Daarentegen werden bij rekruten, die in december 1961 in dienst kwamen, veel vaker antistoffen aangetroffen, namelijk in ongeveer de helft van de gevallen. Het verschil van deze groep met ieder der overige groepen is significant (alle  $P$  waarden  $< 0,01$ ). De bevindingen zouden er op kunnen wijzen, dat

Coxsackie A 21-virus in de maanden oktober en november 1961 vrij intensief onder de burgerbevolking heeft gecirkuleerd.

Tabel 16. *Frekwentie van serologisch vastgestelde infecties met Coxsackie A 21-virus bij rekruten gedurende de basis-opleiding*

Periode	Serologisch vastgestelde infecties met Coxsackie A 21-virus bij rekruten <sup>1)</sup>			
	Wel antistoffen bij opkomst		Geen antistoffen bij opkomst	
	Aantal rekruten	Titerstijging	Aantal rekruten	Titerstijging
1961, juni-juli	9	4	41	16
augustus-				
september	30	8	107	50
oktober-				
november	37	18	113	64
december-				
1962, januari	48	3	52	3

<sup>1)</sup> Signifikante (4-voudige of grotere) titerstijging van neutraliserende antistoffen

Deze veronderstelling wordt gesteund door de uitkomsten van het onderzoek op het voorkomen van infecties tijdens de basis-opleiding van deze rekruten. Uit Tabel 16 kan worden afgeleid, dat Coxsackie A 21-virus reeds in de zomermaanden van 1961 onder de rekruten cirkuleerde. In de periode oktober-november 1961 was de frekwentie van infecties echter hoger dan in de periode augustus-september 1961. Bij vergelijking van de gegevens uit de eerstgenoemde periode, 64 van 113 en 18 van 37 rekruten, met die uit de laatstgenoemde periode, 50 van 107 en 8 van 30 rekruten, voor respectievelijk de rekruten zònder en de rekruten met antistoffen en combinatie van de uitkomsten, bleek het verschil significant te zijn ( $P_{22} = 0,02$ , kombinatietoets voor 2x2-tabellen).

De graad van immuniteit van een bevolkingsgroep is waarschijnlijk niet de enige of de belangrijkste faktor, die invloed uitoefent op de verspreiding van Coxsackie A 21-virus. Uit Tabel 15 blijkt, dat in sera

van rekruten, die respectievelijk in juni, augustus en oktober 1961 in dienst waren gekomen, ongeveer even vaak (18-25%) neutraliserende antistoffen werden gevonden ( $P = 0,60$ ,  $\chi^2$ -toets). De graad van immuniteit was dus vermoedelijk ongeveer gelijk voor deze 3 groepen personen. Toch kwamen er onder rekruten, die in oktober-november werden opgeleid, meer infecties voor dan in de periode augustus-september; bij respectievelijk 82 (55%) van 150 en 58 (42%) van 137 rekruten werd een titerstijging vastgesteld. Rekruten, die in december 1961 waren opgekomen, hadden duidelijk vaker antistoffen dan in de voorgaande perioden (Tabel 15). Uit Tabel 16 blijkt, dat het aantal titerstijgingen in de periode december-januari 1962 duidelijk lager was; slechts 6 van 100 rekruten toonden een titerstijging. Het is mogelijk, dat een hoger graad van immuniteit heeft bijgedragen tot beëindiging van de viruscirculatie.

Uit het onderzoek op patiënten, dat is beschreven in Hoofdstuk IV, 4.3., bleek, dat de aanwezigheid van neutraliserende antistoffen gepaard gaat met bescherming tegen infectie met Cocksackie A 21-virus. Bij willekeurig gekozen rekruten, die in het najaar van 1961 hun basisopleiding kregen, was dit verband eveneens aan te tonen. Uit ons onderzoek tijdens de periode oktober-november 1961, zowel bij patiënten als bij willekeurig gekozen rekruten, is aangetoond, dat Cocksackie A 21-virus in deze periode in belangrijke mate heeft gecirkuleerd. Gegevens uit de literatuur wijzen er eveneens op dat Cocksackie A 21-virus vooral in het najaar cirkuleert (Johnson e.m., 1962; McDonald e.m., 1962). Op grond hiervan hebben wij de resultaten van het onderzoek van de perioden augustus-september en oktober-november nader onderzocht. In beide perioden werden titerstijgingen overwegend gevonden in de groep rekruten, die bij opkomst geen antistoffen hadden; bij respectievelijk 50 van 107 en 64 van 113 rekruten, die bij opkomst géén antistoffen hadden, en bij respectievelijk 8 van 30 en 18 van 37 rekruten, die bij opkomst wél antistoffen hadden, werd een titerstijging aangetoond (Tabel 16). De verschillen voor elke periode afzonderlijk waren niet significant, doch bij combinatie van de uitkomsten uit beide perioden bleek het verschil significant ( $P_{22} = 0,04$ , kombinatietoets voor 2x2-tabellen).

In de perioden juni-juli en december-januari werden ongeveer even vaak titerstijgingen aangetroffen zowel bij rekruten, die bij opkomst wél, als bij rekruten, die bij opkomst géén antistoffen hadden. Het is mogelijk, dat in de periode juni-juli 1961 andere picornavirussen, die antigeen verwant zijn aan Cocksackie A 21-virus, mede hebben gecirku-



leerd. De bevindingen in de periode december-januari 1962 behoeven niet in tegenspraak te zijn met de bevindingen in het najaar, daar het aantal titerstijgingen in december en januari zeer gering is geweest.

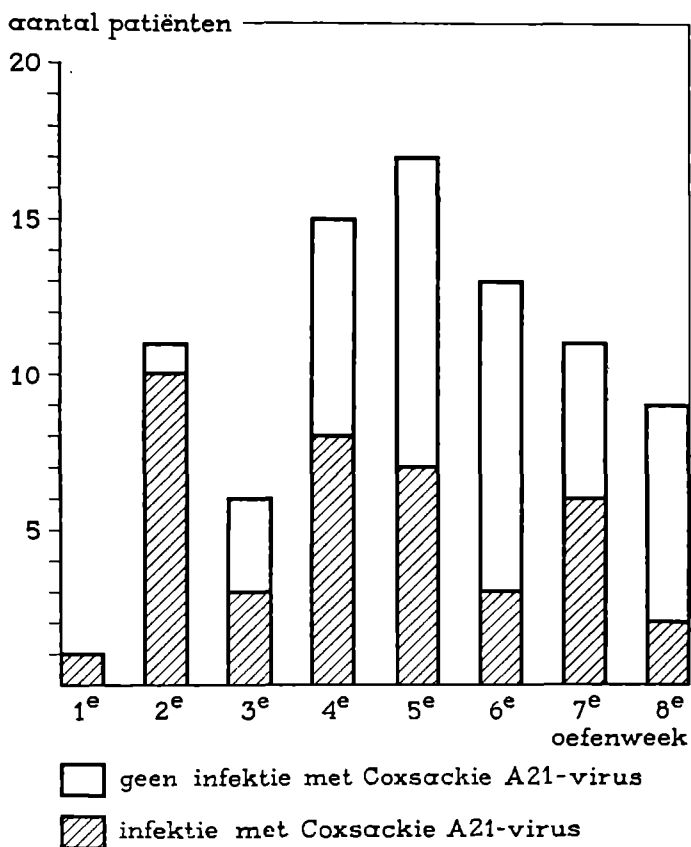
## 5.2. Morbiditeit van rekruten ten gevolge van infecties met Cocksackie A 21-virus

Wij hebben in oktober en november 1961 en in de perioden van oktober 1962-maart 1964 een onderzoek verricht naar de morbiditeit van rekruten ten gevolge van infecties met Cocksackie A 21-virus.

5.2.1. *Onderzoek in de periode oktober-november 1961.* Aangezien de totale morbiditeit van rekruten in oktober en november 1961 hoog was en het serologische onderzoek bij willekeurig gekozen rekruten (zie 5.1.) had aangetoond, dat er in deze maanden veel infecties met Cocksackie A 21-virus waren voorgekomen, hebben wij bij patiënten uit deze periode een uitgebreid onderzoek op Cocksackie A 21-virus ingesteld. Van de 1500 rekruten, die in de legerplaats aanwezig waren, werden 100 (6,7%) wegens een akute aandoening van de luchtwegen op de ziekenzaal opgenomen. Van 83 patiënten was volledig materiaal, zowel keel-sekreet als 2 monsters bloed, beschikbaar voor onderzoek. De uitkomsten van het virologische en serologische onderzoek zijn uitvoerig in Hoofdstuk IV weergegeven. Wij hebben mede op grond van de bevindingen van dit onderzoek aangenomen, dat een patiënt met Cocksackie A 21-virus was geïnfecteerd, indien (1) door middel van één of meer serologische reacties een significante titerstijging van antistoffen werd gevonden, óf (2) virus werd geïsoleerd en deze vondst bij reïsolatie werd bevestigd, óf (3) zowel het serologische als het virologische onderzoek positief was. De resultaten van het onderzoek bij patiënten, bij wie op grond van deze criteria een infectie met Cocksackie A 21-virus is vastgesteld, zijn in Tabel 11 (Hoofdstuk IV) samengevat. In Fig. 4 is het aantal patiënten met infectie door Cocksackie A 21-virus weergegeven voor de verschillende weken van de basis-opleiding.

Bij 40 (48%) van de 83 onderzochte patiënten werd een infectie met Cocksackie A 21-virus vastgesteld. De totale morbiditeit ten gevolge van ziekte van de luchtwegen bij rekruten bedroeg 6,7%. Men mag aannemen, dat 48% van deze ziektegevallen door Cocksackie A 21-virus werd veroorzaakt. De morbiditeit ten gevolge van infecties met Cocksackie A 21-virus bedroeg dus naar schatting 3,2%. Fig. 4 laat zien, dat de ziektegevallen gedurende de gehele periode van de basis-opleiding voorkwamen.

Fig. 4. Aantal patiënten met infectie door Cocksackie A 21-virus in verschillende weken van de basis-opleiding. Periode oktober-november 1961



Voor de periode oktober-november 1961 kan een schatting worden gemaakt van de verhouding van infecties, die met ziekte gepaard gingen, tot subklinisch verlopende infecties. Tabel 16 laat zien, dat 82 (55%) van 150 willekeurig gekozen rekruten neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus hadden ontwikkeld. De onderzochte sera waren direct na opkomst in dienst en in de achtste oefenweek afgenomen, dus met een interval van ruim 7 weken. Men mag aannemen, dat ruim een week na het begin van een infectie antistoffen in het bloed aantoonbaar zijn. Het percentage rekruten, bij wie een titerstijging van antistoffen werd gevonden (55%), is dus een maat voor de frekwentie van infecties tijdens de eerste 6 weken van de basis-opleiding. In de eerste 6 weken

van de basis-opleiding werden 78 (5,2%) van 1500 rekruten wegens ziekte van de luchtwegen opgenomen, terwijl bij 32 (51%) van 63 onderzochte patiënten een infectie met Coxsackie A 21-virus werd vastgesteld. Op grond van deze gegevens mag men aannemen, dat naar schatting 2,7% (= 0,51 maal 5,2%) van alle rekruten tijdens de eerste 6 weken van de basis-opleiding wegens een aandoening door Coxsackie A 21-virus was opgenomen. De totale frekwentie van infecties door Coxsackie A 21-virus was op grond van het serologische onderzoek geschat op 55%. Hieruit volgt, dat infecties met Coxsackie A 21-virus in veruit de meeste gevallen niet gepaard gingen met ziekteverschijnselen of een zeer mild verloop hadden. Slechts in één op de ongeveer 20 gevallen van infectie was opname op de ziekenzaal vereist; de patiënten werden opgenomen, indien er rektaal een lichaamstemperatuur van 38,0° C of hoger werd gemeten.

5.2.2. *Onderzoek in de periode oktober 1962-maart 1964.* In het kader van een longitudinaal onderzoek naar de etiologie van akute aandoeningen van de luchtwegen bij rekruten werd bij patiënten, bij wie géén infectie was aangetoond met adeno-, influenza A- en influenza B-virus, een serologisch en virologisch onderzoek verricht naar infecties met Coxsackie A 21-virus. Voor het serologische onderzoek werd gebruik gemaakt van de komplementbindingsreactie. Hoewel de komplementbindingsreactie misschien iets minder gevoelig en waarschijnlijk minder type-specifiek is dan de neutralisatie- en hemagglutineringsreactie (zie Hoofdstuk IV), hebben wij toch om tijd en werk te besparen uitsluitend onderzoek op komplementbindende antistoffen verricht. Het is duidelijk, dat door middel van dit onderzoek alleen een zeer grove schatting van de werkelijke frekwentie van infecties met Coxsackie A 21-virus of hieraan verwante virussen kan worden gemaakt, die vermoedelijk te laag is. Het serologische onderzoek werd aangevuld met virusisatieproeven. Hiervoor werd gebruik gemaakt van HeLa-cellen, verse kweken van apeniercellen en diploïde cellen afkomstig van longweefsel van de mens (WI-38, Flow Laboratories, U.S.A.).

Van de 17.671 rekruten, die tussen oktober 1962 en april 1964 in dienst waren gekomen, werden 964 (5,5%) tijdens de basis-opleiding wegens een akute aandoening van de luchtwegen op de ziekenzaal opgenomen. Bij 629 patiënten werd serologisch onderzoek op adeno-, influenza A- en influenza B-virus verricht. Bij 264 van hen werd een significante titerstijging van antistoffen gevonden; het onderzoek was negatief in 365 gevallen. Sera van 320 patiënten, bij wie het onderzoek

op adenovirus, influenza A-virus en influenza B-virus negatief was uitgevallen, werden onderzocht op komplementbindende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus. De resultaten van het onderzoek zijn in Tabel 17 weergegeven.

Tabel 17. *Onderzoek op komplementbindende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus bij 320 rekruten met akute aandoeningen van de luchtwegen*

Periode	Aantal serologisch onderzochte patiënten	Aantal positieve gevallen <sup>1)</sup>
1962, oktober-november	18	1
december-januari	13	0
1963, februari-maart	26	0
april-mei	25	2
juni-juli	50	3
augustus-september	57	0
oktober-november	40	5
december-januari	50	4
1964, februari-maart	41	1
Totaal	320	16

<sup>1)</sup> Signifikante (4-voudige of grotere) titerstijging van komplementbindende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus.

Uit Tabel 17 blijkt, dat slechts 16 van de 320 onderzochte patiënten een significante titerstijging van komplementbindende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus toonden. De infecties met Cocksackie A 21-virus (of met een hieraan verwant virus) waren niet gekoncentreerd in een bepaald tijdvak. Keelsekreet van 318 patiënten werd virologisch onderzocht; in geen enkel geval werd Cocksackie A 21-virus geïsoleerd. Sera van de 16 positieve gevallen zijn tevens onderzocht op neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus; in geen enkel geval werd een titerstijging van neutraliserende antistoffen vastgesteld.

Uit het onderzoek blijkt, dat Cocksackie A 21-virus in de periode van oktober 1962 tot maart 1964 geen belangrijke rol heeft gespeeld in de etiologie van akute aandoeningen van de luchtwegen. Op grond van de resultaten van de komplementbindingsreacties zou ongeveer 5% van

de gevallen van ziekte van de luchtwegen, die in deze periode voorkwamen en die niet door adenovirus of influenzavirus waren veroorzaakt, aan een infectie met Cocksackie A 21-virus kunnen worden toegeschreven. Het is echter waarschijnlijk, dat de positieve uitkomsten van het onderzoek op komplementbindende antistoffen voor een groter of kleiner deel berustten op heterotypische reacties ten gevolge van infecties met andere Cocksackie- of picornavirussen, aangezien in geen enkel geval Cocksackie A 21-virus werd geïsoleerd en bij geen van de 16 positieve gevallen een titerstijging van neutraliserende antistoffen werd gevonden.

### 5.3. Onderzoek naar infecties met Cocksackie A 21-virus bij kinderen met akute aandoeningen van de luchtwegen

Om een indruk te verkrijgen van de betekenis van Cocksackie A 21-virus voor de etiologie van akute luchtwegziekten bij kinderen hebben wij een onderzoek verricht bij patiëntjes, die in het ziekenhuis waren opgenomen wegens een akute aandoening van de luchtwegen en/of longen. Het onderzoek werd gedaan in de jaren 1961, 1963 en 1964. Keelsekreet van de patiëntjes werd zo snel mogelijk naar het laboratorium vervoerd en direct, zonder bevroren te zijn geweest, geënt in HeLa-cellen en in verse kweken van apeniercellen. Bij opneming en 10-14 dagen later werd bloed afgenomen, dat op komplementbindende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus werd onderzocht. Sera van één patiëntje werden steeds in dezelfde proef onderzocht.

Tabel 18. *Kinderen met akute luchtwegziekten, die virologisch en serologisch op Cocksackie A 21-virus zijn onderzocht*

Leeftijd	Aantal onderzochte patiëntjes	Aandoening	
		Lagere luchtwegen en/of longen	Bovenste luchtwegen
Jonger dan 1 jaar	95	80	15
1-5 jaar	163	109	54
6 jaar en ouder	27	8	19
Totaal	285	197	88

Tabel 19. *Onderzoek bij 3 patiëntjes, bij wie een titerstijging van komplementbindende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus was vastgesteld*

No.	Leef-tijd	Diagnose	Isolatie van virus uit keelsekreet	Neutraliserende antistoftiter tegen						Komplement-bindende antistoftiter tegen	
				Coxsackie B 3-virus		Coxsackie B 2-virus		Coxsackie A 21-virus		Coxsackie A 21-virus	
				Akute fase	Rekonv.	Akute fase	Rekonv.	Akute fase	Rekonv.	Akute fase	Rekonv.
1	1 j.	Pneumonie	Coxsackie B 3	16	$\geq 512$	N.O. <sup>1)</sup>	N.O.	<8	<8	<5	20
2	1 j.	Faryngitis	Coxsackie B 2	N.O.	N.O.	<8	512	<8	<8	<5	40
3	2 j.	Faryngitis	Negatief	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	<8	<8	<5	20

<sup>1)</sup> Niet onderzocht.

Bij 285 patiëntjes werd zowel virologisch als serologisch onderzoek verricht. In Tabel 18 zijn enkele gegevens van de onderzochte patiëntjes vermeld. Het virologische onderzoek op Coxsackie A 21-virus was in geen enkel geval positief. Bij 3 patiëntjes, die in juni en juli 1963 werden opgenomen, werd een significante titerstijging van komplementbindende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus vastgesteld. Het onderzoek op neutraliserende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus was echter negatief. Bij 2 van deze 3 patiëntjes werd Coxsackie B-virus geïsoleerd, respectievelijk Coxsackie B 2- en Coxsackie B 3-virus. De typering van deze stammen werd verricht door Dr. J. G. Kapsenberg, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht. Sera van patiëntjes, bij wie bovengenoemde virussen werden geïsoleerd, zijn onderzocht op neutraliserende antistoffen tegen het homologe virus. De uitkomsten van de onderzoeken zijn samengevat in Tabel 19.

Van 72 patiëntjes, die in 1961 met een akute luchtwegziekte werden opgenomen, was het onderzoek op komplementbindende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus geheel negatief. Sera van 67 van deze patiëntjes zijn met de neutralisatiereactie onderzocht. Bij 2 patiëntjes werden neutraliserende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus in de sera uit de akute fase van de ziekte aangetoond. Er werden géén titerstijgingen waargenomen.

Hoewel was aangetoond, dat in het najaar 1961 Coxsackie A 21-virus onder de militairen had gecirkuleerd, blijkt uit het onderzoek tijdens een overeenkomstige periode bij kinderen, dat dit virus van weinig betekenis is geweest voor de etiologie van akute aandoeningen van de luchtwegen bij kinderen.

### **Beschouwing:**

Infekties met Coxsackie A 21-virus werden reeds vastgesteld bij willekeurig gekozen rekruten, die in juni-juli 1961 hun basis-opleiding kregen; bij 20 (40%) van 50 onderzochte rekruten werd een significante titerstijging van neutraliserende antistoffen aangetoond. Bij rekruten, die in augustus-september waren opgeleid, werden infekties in ongeveer dezelfde verhouding aangetroffen, namelijk bij 58 (42%) van 137 onderzochte rekruten. Het aantal infekties nam echter duidelijk toe bij rekruten, die in oktober-november werden opgeleid, bij 82 (55%) van 150 onderzochte rekruten werd een infectie waargenomen. De epidemie eindigde in december; slechts 6 van 100 onderzochte rekruten ontwik-

kelden antistoffen tijdens de basis-opleiding in december-januari 1962. De toenemende verspreiding van virus in oktober-november stond niet in verband met de graad van immuniteit van de rekruten, die in oktober opkwamen. Het percentage rekruten, dat bij opkomst in dienst neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus had, was voor de 3 groepen, die respectievelijk in juni, augustus en oktober opkwamen, ongeveer gelijk (18-25%). Ook bij rekruten, die in oktober 1960, februari 1961 en april 1961 in dienst opkwamen, werd ongeveer hetzelfde percentage gevonden. Onze bevindingen komen overeen met de resultaten van een onderzoek bij rekruten van de Royal Air Force in Engeland (McDonald e.m., 1962), die in januari 1960 in dienst kwamen; bij 39 (19%) van 205 onderzochte rekruten werden bij opkomst neutraliserende antistoffen aangetoond. Johnson en medewerkers (1962) vonden bij een onderzoek in een Amerikaanse legerkamp, dat slechts 5-10% van de rekruten bij opkomst antistoffen hadden. Dit verschil is mogelijk te verklaren, door het verschil in bevolkingsdichtheid van Europa en Amerika. In ons onderzoek werd een aanwijzing gevonden, dat Cocksackie A 21-virus ook in de burgerbevolking heeft gecirkuleerd.

De epidemie eindigde in december 1961. De rekruten, die in december en januari werden opgeleid, hadden bij opkomst een hoge graad van immuniteit. Deze situatie werd eveneens in het Amerikaanse onderzoek aangetroffen (Johnson e.m., 1962). Het is mogelijk, dat een hogere graad van immuniteit invloed heeft gehad op het afnemen van de viruscirculatie.

Het is uit ons onderzoek gebleken, dat de verspreiding van Cocksackie A 21-virus vooral in het najaar heeft plaats gevonden. Er kan worden opgemerkt, dat infecties met Cocksackie A 21-virus bij militairen in andere landen met een gematigd klimaat eveneens hoofdzakelijk in het najaar zijn waargenomen (Johnson e.m., 1962; Kjersgaard e.m., 1962; McDonald e.m., 1962). Het is mogelijk, dat klimatologische factoren een belangrijke oorzaak zijn voor de verspreiding van Cocksackie A 21-virus.

Zowel bij patiënten uit de periode oktober-november 1961 als bij willekeurig gekozen rekruten, die in het najaar 1961 hun basis-opleiding kregen, is aangetoond, dat de aanwezigheid van neutraliserende antistoffen gepaard gaat met bescherming tegen infectie met Cocksackie A 21-virus. De bescherming is echter slechts partiël. Infecties kwamen voor bij aanwezigheid van neutraliserende antistoffen, hetgeen ook door andere onderzoekers (Bloom e.m., 1962; Johnson e.m., 1962; McDonald



e.m., 1962) is waargenomen. Er zijn in ons onderzoek aanwijzingen, dat de titer van antistoffen van belang is bij bescherming tegen infecties. Bij 20 van 124 rekruten, bij wie bij opkomst een titer van neutraliserende antistoffen van 64 of groter was gevonden, werden geen titerstijgingen aangetroffen. Het verband tussen de titer van antistoffen en bescherming tegen infectie werd eveneens waargenomen bij vrijwilligers, die met Cocksackie A 21-virus werden besmet (Spickard e.m., 1963). Bij 5 van 11 vrijwilligers, die een hoge antistoftiter hadden, werd virus uit de keel geïsoleerd; bij 19 vrijwilligers, die een lage of géén antistoftiter hadden, werd in alle gevallen virus in de keel aangetroffen.

In de maanden oktober en november 1961 was de totale morbiditeit ten gevolge van akute aandoeningen van de luchtwegen bij rekruten 6,7%. Bij 40 (48%) van 83 onderzochte patiënten werd in deze periode een infectie met Cocksackie A 21-virus vastgesteld. Op grond hiervan kan de morbiditeit ten gevolge van infecties met Cocksackie A 21-virus worden geschat op 3,2%.

Uit ons onderzoek blijkt, dat naar schatting 1 op de 20 infecties met Cocksackie A 21-virus gepaard ging met ziekteverschijnselen (o.a. lichaamstemperatuur van 38,0° C of hoger), op grond waarvan opname op de ziekenzaal vereist was. Deze waarneming komt overeen met de bevindingen van Bloom en medewerkers (1962) bij een onderzoek in een Amerikaans legerkamp. Zij vonden, dat 1 op de 8 rekruten, die met Cocksackie A 21-virus waren geïnfecteerd, zich op het ziekenrapport meldde; bij 1 van de 5 rekruten, die zich wegens een infectie met Cocksackie A 21-virus hadden gemeld, was de lichaamstemperatuur verhoogd. De uitkomsten van ons onderzoek en van het Amerikaanse onderzoek wijzen erop, dat infecties met Cocksackie A 21-virus bij rekruten meestal zonder ziekteverschijnselen of met geringe verschijnselen verlopen.

Het onderzoek bij 285 kinderen met aandoeningen van de luchtwegen, dat werd verricht bij patiëntjes, die in de jaren 1961, 1963 en 1964 waren opgenomen, heeft aangetoond, dat Cocksackie A 21-virus geen belangrijke oorzaak was van akute ziekten van de luchtwegen en/of longen. Slechts bij 3 patiëntjes werd een ontwikkeling van complementbindende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus waargenomen. Bij 2 van deze patiëntjes werd respectievelijk Cocksackie B 2- en Cocksackie B 3-virus uit de keel afgezonderd. Géén van de patiëntjes ontwikkelde neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus. Het is dus mogelijk, dat de titerstijging van complementbindende antistoffen bij deze kinderen berustte op een heterotypische reactie ten gevolge

van infectie met verwante virussen, in casu Cocksackie B 2- en Cocksackie B 3-virus.

De geringe betekenis van Cocksackie A 21-virus als oorzaak van aandoeningen van de luchtwegen bij kinderen komt overeen met de bevindingen van Pereira en medewerkers (1959). Zij vonden bij slechts één van 78 kinderen beneden de 10 jaar neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus; meer dan de helft van deze kinderen had kort tevoren geleden aan een aandoening van de luchtwegen. Fukumi en medewerkers (1961) hebben bij een onderzoek onder schoolkinderen waargenomen, dat één van 53 kinderen uit de eerste klas en één van 32 kinderen uit de zesde klas neutraliserende antistoffen tegen Cocksackie A 21-virus bezaten. Deze waarnemingen wijzen erop, dat Cocksackie A 21-virus slechts in geringe mate onder de kinderen had gecirkuleerd.

## SAMENVATTING

Er werd een onderzoek ingesteld naar het voorkomen van infecties met Cocksackie A 21-virus (enterovirus 24) bij militairen en naar de betekenis van Cocksackie A 21-virus als verwekker van akute respiratoire aandoeningen bij kinderen.

Infecties met Cocksackie A 21-virus werden aangetoond door middel van virologisch en serologisch onderzoek. In verband met isolatieproeven en bereiding van antigenen voor serologische reacties werden enkele methoden om virus te kweken nader bestudeerd. Virus werd geënt in verschillende cellijnen. Het bleek, dat er alleen cytopathologische veranderingen optraden in cellijnen, die afkomstig waren van menselijke weefsels. In cellijnen, die waren afgeleid van dierlijke weefsels, met name lenskapsel van een kalf en nierschors van een varken, waren geen celveranderingen waar te nemen.

Een onderzoek naar de vermenigvuldiging van virus in HeLa-cellen toonde aan, dat er 8 uren na enting vermeerdering van virus had plaats gevonden. Na 24 uren was de maximale produktie van infectieus virus vrijwel bereikt. Er was geen verschil in produktie van virus tussen kulturen, die stationair waren geïnkubeerd, en kulturen, die in een draaiende trommel waren geplaatst.

Uit een onderzoek naar de vorming van hemagglutinenen door Cocksackie A 21-virus in HeLa-cellen bleek, dat in de door ons onderzochte HeLa-celijn geen vermeerdering van hemagglutinerende partikels kon worden aangetoond. In het kweekmedium was een faktor aanwezig, die hemagglutinatie verhinderde. Door behandeling van een virussuspensie met fluorocarbon kon de remmende faktor worden verwijderd. Hierna werd de hemagglutinatiereactie positief.

Bij caviae werd een onderzoek verricht naar de ontwikkeling van neutraliserende en hemagglutinatieremmende antistoffen. Na intramuskulaire toediening van virus werden neutraliserende en hemagglutinatieremmende antistoffen gevormd. Het tijdstip, waarop antistoffen waren aan te tonen, en de hoogte van de antistoftiter waren afhankelijk van de hoeveelheid toegediende virus. Na intranasale toediening van virus werden geen neutraliserende antistoffen gevormd.

Virologisch en serologisch onderzoek werd verricht bij 83 patiënten uit de legerplaats Ossendrecht, die in oktober en november 1961 waren opgenomen wegens een akute respiratoire aandoening. Bij 40 (48%) van hen was het onderzoek op Coxsackie A 21-virus positief. Het virus werd bij 24 (29%) patiënten uit de keel afgezonderd en het serologische onderzoek was bij 34 (41%) patiënten positief.

Proeven om virus te isoleren werden verricht in 3 soorten celkweken: HeLa-cellen, verse kweken van schildklierweefsel en verse kweken van foetaal nierweefsel. Keelsekreet van 23 patiënten werd gelijktijdig in HeLa-cellen en in een verse celkweek geënt. Van de overige 60 patiënten werd keelsekreet eerst alleen in HeLa-cellen geënt; in 52 gevallen werd keelsekreet op een later tijdstip bovendien in verse kweken van schildklier- en foetale niercellen onderzocht. Bij 7 patiënten werd Coxsackie A 21-virus zowel in HeLa-cellen als in verse kweken afgezonderd, bij 9 patiënten alleen in HeLa-cellen en bij 8 patiënten alleen in verse kweken (6 maal alleen in schildkliercellen en 2 maal alleen in foetale niercellen). Verse kweken van schildkliercellen lijken zeer gevoelig voor de isolatie van Coxsackie A 21-virus, doch een vergelijking van de gevoeligheid van deze cellen met die van de andere 2 celsoorten is niet mogelijk, daar het aantal positieve monsters keelsekreet, dat gelijktijdig in verschillende celkweken is geënt, te klein was.

Bij 83 virologisch onderzochte patiënten werd serologisch onderzoek verricht met behulp van de neutralisatie-, hemagglutinatieremmings- en komplementbindingsreactie. Bij 18 patiënten werd door middel van twee of drie reacties een significante titerstijging vastgesteld (10 maal met alle drie reacties en 8 maal met twee reacties, waarvan 7 maal met de neutralisatie- en hemagglutinatieremmingsreactie en 1 maal met de neutralisatie- en komplementbindingsreactie). Bij 16 patiënten was slechts één reactie positief (de neutralisatiereactie 7 maal, de hemagglutinatieremmingsreactie eveneens 7 maal en de komplementbindingsreactie 2 maal). De gevoeligheid van het serologische onderzoek om infecties met Coxsackie A 21-virus aan te tonen werd duidelijk groter, indien er verschillende serologische reacties naast elkaar werden toegepast. Er kon een schatting worden gemaakt van de gevoeligheid van de serologische reacties bij de patiënten, bij wie virus in de keel was aangetoond. Bij 18 (75%) van de 24 virologisch positieve patiënten werd met behulp van één of meer reacties een stijging van de antistof-titer vastgesteld. Serologisch onderzoek door middel van 3 serologische reacties liet in 25% van de gevallen in de steek. Bij toepassing van de komplementbindings-, de hemagglutinatieremmings- of de neutralisatie-

reactie alleen zou het onderzoek in respectievelijk 58%, 46% en 37% gefaald hebben.

Uit het onderzoek bij de bovengenoemde 83 patiënten bleek verder, dat er een duidelijk verband was tussen ontwikkeling van neutraliserende, hemagglutinatieremmende en komplementbindende antistoffen en isolatie van virus, hetgeen een aanwijzing vormt voor de specificiteit van de serologische reacties bij de door ons onderzochte patiënten. Ook kon een duidelijk verband worden aangetoond tussen afwezigheid van neutraliserende en hemagglutinatieremmende antistoffen in de akute fase van de ziekte enerzijds en isolatie van virus en antistofontwikkeling anderzijds. De aanwezigheid van neutraliserende en hemagglutinatieremmende antistoffen wijst dus op een zekere mate van immuniteit tegen infectie met Cocksackie A 21-virus. Er werd geen verband gevonden tussen aanwezigheid van komplementbindende antistoffen en infectie met Cocksackie A 21-virus; bij alle patiënten, bij wie virus was afgezonderd, werden komplementbindende antistoffen aangetroffen in de akute fase van de ziekte.

Een onderzoek bij willekeurig gekozen rekruten uit de legerplaats Ossendrecht toonde aan, dat Cocksackie A 21-virus onder 3 groepen rekruten, die tussen juni en december 1961 een basis-opleiding van 8 weken ontvingen, heeft gecirculeerd. Tijdens de basis-opleiding werd bij respectievelijk 40%, 42% en 55% van de onderzochte rekruten een titerstijging van neutraliserende antistoffen vastgesteld. De viruscirculatie was in het najaar duidelijk hoger. In december 1961 eindigde de epidemie; slechts 6% van de onderzochte rekruten ontwikkelden neutraliserende antistoffen tijdens de opleiding in december-januari 1962. Op grond van gegevens van het onderzoek in oktober-november 1961 kon een schatting worden gemaakt van de ziektefrekwentie. Het bleek, dat infecties met Cocksackie A 21-virus in veruit de meeste gevallen een zeer mild verloop hadden. Slechts in 1 op ongeveer 20 gevallen was opname op de ziekenzaal vereist.

In de periode van oktober 1962 tot maart 1964 bleek Cocksackie A 21-virus geen belangrijke rol te hebben gespeeld in de etiologie van akute respiratoire aandoeningen bij militairen. Bij 16 van 320 patiënten, bij wie geen infectie met adenovirus of influenzavirussen was vastgesteld, was het onderzoek op de ontwikkeling van komplementbindende antistoffen positief. De positieve patiënten toonden geen titerstijging van neutraliserende antistoffen; evenmin werd er bij hen Cocksackie A 21-virus geïsoleerd. Het is mogelijk, dat de ontwikkeling van komplement-

bindende antistoffen in een deel der gevallen berustte op heterotypische reakties ten gevolge van infecties met andere picornavirussen.

Er werd ook een onderzoek verricht bij 285 kinderen met aandoeningen van de luchtwegen, die in de jaren 1961, 1963 en 1964 waren opgenomen. Coxsackie A 21-virus bleek geen belangrijke oorzaak van ziekte te zijn. Drie patiëntjes, die in 1963 waren opgenomen, toonden een titerstijging van komplementbindende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus. Bij 2 van hen werd door middel van virologisch en serologisch onderzoek een infectie met respectievelijk Coxsackie B 2- en Coxsackie B 3-virus vastgesteld. Bij de overige 282 patiëntjes was het onderzoek op komplementbindende antistoffen tegen Coxsackie A 21-virus negatief. Sera van 67 patiëntjes, die in 1961 waren opgenomen, werden onderzocht met behulp van de neutralisatiereactie. Slechts bij 2 patiëntjes werden antistoffen gevonden in de akute fase van de ziekte. In geen enkel geval werd een titerstijging van neutraliserende antistoffen vastgesteld. Bij geen van de 285 kinderen werd Coxsackie A 21-virus uit de keel geïsoleerd.

## SUMMARY

A study of the incidence of infections with Coxsackie A-21 virus (enterovirus 24) in military personnel, and of the significance of Coxsackie A-21 virus as a cause of acute respiratory disease in children was made.

Coxsackie A-21 virus infections were demonstrated by means of virological and serological tests. In the context of isolation tests and the preparation of antigens for serological reactions, some methods of virus cultivation were studied in detail. Virus was inoculated into different cell cultures derived from human tissues. In cell cultures derived from animal tissues, particularly the lens capsule of a calve and the renal cortex of a pig, no cellular changes were observed.

A study of virus multiplication in HeLa cell cultures indicated that the virus had multiplied 8 hours after inoculation. The maximum production of infectious virus was reached after 24 hours. There was no difference in virus production between cultures incubated in a stationary position and those incubated in a rotating drum.

A study of haemagglutinin formation by Coxsackie A-21 virus in HeLa cell cultures showed that in the HeLa cell culture under investigation, there was no demonstrable increase in haemagglutinating particles. The culture medium contained a factor inhibiting haemagglutination, which could be eliminated by treating the virus suspension with fluorocarbon, after which the haemagglutination reaction became positive.

The production of neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies was investigated in guinea-pigs. It was found that such antibodies were developed after intramuscular injection of the virus. The time at which antibodies were demonstrable and the level of the antibody titre were dependent on the quantity of virus administered. After intranasal application of virus, no neutralizing antibodies were developed.

A virological and serological study was made in 83 patients in a military camp at Ossendrecht, hospitalized with acute respiratory disease during October/November 1961. Tests for Coxsackie A-21 virus were

positive in 40 patients (48%). In 24 cases (29%), the virus was isolated from the throat; serological findings were positive in 34 patients (41%).

Virus isolation tests were carried out in three types of cell culture, viz, HeLa cell cultures, fresh cultures of human thyroid tissues and fresh cultures of human foetal renal tissues. Throat secretions from 23 patients were simultaneously inoculated into HeLa cells and into a fresh cell culture. Throat secretions from the remaining 60 patients were first inoculated only into HeLa cells; in 52 of these cases, throat secretions were later also examined in fresh cultures of thyroid and foetal renal cells. In 7 cases, Coxsackie A-21 virus was isolated both in HeLa cells and in fresh cultures; in 9 cases it was isolated only in HeLa cells, and in 8 cases only in fresh cultures (in 6 only in thyroid cells and in 2 only in foetal renal cells). Fresh thyroid cell cultures would seem to be very sensitive for isolation of Coxsackie A-21 virus; however, it is impossible to compare the sensitivity of these cells with that of the two other cell types, because the number of positive throat secretion samples simultaneously inoculated into different cell cultures was too small.

In 83 virologically examined cases, a serological study was made with the aid of the neutralization, haemagglutination inhibition and complement fixation tests. In 18 cases, these reactions or two of these reactions demonstrated a significant rise in titre (in 10 cases by three, and in 8 cases by two reactions, including 7 cases involving the neutralization and haemagglutination inhibition reactions, and 1 involving the neutralization and complement fixation reactions). In 16 cases only one reaction was positive (the neutralization test in 7, the haemagglutination inhibition test in 7 and the complement fixation test in 2 cases). The sensitivity of serological tests used in demonstrating Coxsackie A-21 virus infections was clearly enhanced when three serological tests were employed in combination. The sensitivity of serological tests could be estimated in patients in whom virus had been demonstrated in the throat. In 18 (75%) of 24 virologically positive patients, one or more serological tests showed a rise in antibody titre. A three-test serological study failed in 25% of cases. Using the complement fixation, haemagglutination inhibition or neutralization test alone, the attempt would have failed in 58%, 46% and 37% of cases, respectively.

The study of these 83 patients also showed that a correlation existed between the production of neutralizing, haemagglutination-inhibiting and complement-fixing antibodies on the one hand, and isolation of virus on the other; this indicates that the serological tests in the patients examined were specific. A distinct correlation was also demonstrable



between the absence of neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies during the acute phase of the disease, and isolation of virus and antibody development on the other hand. The presence of neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies therefore is indicative of the existence of some degree of immunity to Coxsackie A-21 virus infection. No correlation was established between the presence of complement-fixing antibodies and Coxsackie A-21 virus infection: in all patients from whom virus had been isolated, complement-fixing antibodies were found in the acute phase of the disease.

A study of a random group of recruits from the camp at Ossendrecht demonstrated that Coxsackie A-21 virus had been present in three groups of recruits during an 8-week period of basic training between June and December 1961. During the period of basic training, a rise in titre of neutralizing antibodies was demonstrated in 40%, 42% and 55% of recruits, respectively. The virus infection rate was significantly higher during the autumn months. The epidemic ended in December 1961; only 6% of the recruits examined developed neutralizing antibodies during the training period in December 1961/January 1962. On the basis of data obtained during October/November 1961, the incidence of illness could be estimated. It was found that Coxsackie A-21 virus infection took a very mild course in the vast majority of cases. Admission to the sick quarters was required in only 1 out of some 20 cases.

During the period from October 1962 to March 1964, Coxsackie A-21 virus was found not to have played an important role in the aetiology of acute respiratory disease in military personnel. In 16 out of 320 patients in whom no adenovirus or influenza virus infection had been diagnosed, the test for the development of complement-fixing antibodies was positive. The positive patients showed no rise in the titre of neutralizing antibodies, nor was Coxsackie A-21 virus isolated from them. It is possible that in a proportion of cases, the development of complement-fixing antibodies represented a heterotypical reaction as a result of infections with other picornaviruses.

Another study was made of 285 children with respiratory infections, hospitalized during the years 1961, 1963 and 1964. Coxsackie A-21 virus was found not to be an important aetiological factor.

Three patients hospitalized in 1963 showed a rise in the titre of complement-fixing antibodies against Coxsackie A-21 virus. In two of them, virological and serological findings indicated that they were infected with Coxsackie B-2 and Coxsackie B-3 virus, respectively. The

remaining 282 patients were negative for complement-fixing antibodies against Coxsackie A-21 virus. Sera from 67 patients hospitalized in 1961 were examined by the neutralization test. Only in 2 cases were antibodies found during the acute phase of the disease. None of the 67 patients showed a rise in titre of neutralizing antibodies. In none of the 285 children was Coxsackie A-21 virus isolated from the throat.

## LITERATUUR

- Abraham, A. S.* Observations on the properties and prevalence of Coe virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 109, 855 (1962).
- Andrewes, C. H., Burnet, F. M., Enders, J. F., Gard, S., Hirst, G. K., Kaplan, M. M. en Zhdanov, V. M.* Taxonomy of viruses infecting vertebrates: present knowledge and ignorance. *Virology* 15, 52 (1961).
- Beeman, E. A. en Huebner, R. J.* Evaluation of serological methods for demonstrating antibody responses to group A Cocksackie (herpangina) viruses. *J. Immunol.* 68, 663 (1952).
- Bloom, H. H., Johnson, K. M., Mufson, M. A. en Chanock, R. M.* Acute respiratory disease associated with Cocksackie A-21 virus infection. II. Incidence in military personnel: Observations in a non-recruit population. *J.A.M.A.* 179, 120 (1962).
- Committee on the Enteroviruses.* The enteroviruses. *Am. J. Publ. Hlth.* 47, 1556 (1957).
- Classification of human enteroviruses. *Virology* 16, 501 (1962).
- Contreras, G., Barnett, V. H. en Melnick, J. L.* Identification of Cocksackie viruses by immunological methods and their classification into 16 antigenically different types. *J. Immunol.* 69, 395 (1952).
- Dalldorf, G.* Neuropathogenicity of certain group-A Cocksackie viruses. *J. Exper. Med.* 106, 69 (1957).
- Dalldorf, G. en Sickles, G. M.* An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science* 108, 61 (1948).
- Dijkman, J. H.* Onderzoek over het voorkomen en de oorzaken van longafwijkingen bij militairen met akute luchtweginfecties. Dissertatie Nijmegen (1963).
- Dunnebacke, T. H. en Mattern, C. F. T.* Adaptation of Cocksackie virus strain A-10 to human amnion cells in tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 105, 553 (1960).
- Eagle, H.* Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 89, 36 (1955).
- Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501 (1955).
- Frommhamen, L. H. en Martins, M. J.* The purification and physicochemical properties of two viruses associated with respiratory diseases. *Virology* 15, 30 (1961).
- Fukumi, H., Nishikawa, F., Sonoguchi, T. en Shimizu, T.* Isolation of Coe virus and some sero-epidemiological surveys of Coe virus infections. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 14, 21 (1961).
- Gey, G. D., Coffman, W. D. en Kubicek, M. T.* Tissue culture studies of proliferative capacity of cervical and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264 (1952).
- Goetz, O.* Die Bedeutung der Komplementbindungsreaktion für die Diagnostik von Cocksackie-Infektionen. *Zeitschr. Kinderheilk.* 82, 217 (1958).

- Grodums, E. J. en Dempster, G. The pathogenesis of Coxsackie group B viruses in experimental infection. *Canad. J. Microbiol.* 8, 105 (1962).
- Hammon, W. McD., Yohn, D. S., Ludwig, E. H., Pavia, R. A. en Sather, G. E. A study of certain nonpoliomyelitis and poliomyelitis enterovirus infections. *J.A.M.A.* 167, 727 (1958).
- Hayflick, L. en Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strain. *Exper. Cell Res.* 25, 285 (1961).
- Horne, R. W. en Wildy, P. Symmetry in virus architecture. *Virology* 15, 348 (1961).
- International Subcommittee on Virusnomenclature. Picornavirus group. *Virology* 19, 114 (1963).
- Johnson, K. M., Bloom, H. H., Rosen, L., Mufson, M. A. en Chanock, R. M. Hemagglutination by Coe virus. *Virology* 13, 373 (1961).
- Johnson, K. M. en Lang, D. J. Separation of hemagglutinating and non-hemagglutinating variants of Coxsackie A-21 virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 110, 653 (1962).
- Johnson, K. M., Bloom, H. H., Mufson, M. A. en Chanock, R. M. Acute respiratory disease associated with Coxsackie A-21 virus infection. I. Incidence in military personnel: Observations in a recruit population. *J.A.M.A.* 179, 112 (1962).
- Johnson, R. T., Buescher, E. L., Rogers, N. G., Funkenbusch, M. J. en Oliu, W. E. Epidemic central nervous system disease of mixed enterovirus etiology. II. Analysis of laboratory investigations. *Am. J. Hyg.* 71, 331 (1960).
- Johnsson, T., Lycke, E., Wictorin, B. en Jönsson, B. Studies of an epidemic of aseptic meningitis in association with Coxsackie and Echo viruses. II. Serological and clinical observations. *Arch. ges. Virusforsch.* 8, 285 (1958).
- Jordan, W. S. Jr. Stability characteristics of Coe virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 103, 506 (1960).
- Kamitsuka, P. S., Lou, T. Y., Fabiyi, A. en Wenner, H. A. Preparation and standardization of Coxsackievirus reference antisera. *Am. J. Epidem.* 81, 283 (1965).
- Kapsenberg, J. G. en Smeenk, C. Infecties door coxsackie-virus, type B 5, in Nederland in 1961. *Ned. Tijdschr. voor Geneesk.* 107, 1968 (1963).
- Ketler, A., Hamparian, V. V. en Hilleman, M. R. Characterization and classification of Echo-Rhinovirus-Coryzavirus agents. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 110, 821 (1962).
- Kjersgaard, R., Lindbom, G., Dinter, Z. en Philipson, L. The aetiology of respiratory tract infections in military personnel. 4. The recovery of Coxsackie A-21 virus from cases with minor respiratory disease. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinav.* 56, 465 (1962).
- Kok, G. J. P. C. M. Aandoeningen der luchtwegen bij recruten door adenovirussen. *Dissertatie Nijmegen* (1957).
- Kraft, L. M. en Melnick, J. L. Complement fixation tests with homologous and heterologous types of Coxsackie virus in man. *J. Immunol.* 68, 297 (1952).
- Lehman-Grube, F. en Syverton, J. T. Pathogenicity for suckling mice of Coxsackie viruses adapted to human amnion cells. *Fed. Proc.* 18, 488 (1959).

- Lenahan, M. F. en Wenner, H. A.* Propagation of group A Coxsackie viruses in primary human amnion cells. I. Cytopathic changes produced by 5 more serotypes. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 107, 544 (1961).
- Lennette, E. H., Fox, V. L., Schmidt, N. J. en Culver, J. O.* The Coe virus. An apparently new virus recovered from patients with mild respiratory disease. *Am. J. Hyg.* 68, 272 (1958).
- Lennette, E. H., Shinomoto, T. T., Schmidt, N. J. en Magoffin, R. L.* Observations on the neutralizing antibody response to group B Coxsackie viruses in patients with central nervous system disease. *J. Immunol.* 86, 257 (1961).
- Lennette, E. H., Schmidt, N. J. en Magoffin, R. L.* Observations on the complementfixing antibody response to poliovirus in patients with certain Coxsackie and Echo virus infections. *J. Immunol.* 86, 552 (1961).
- Mayor, H. D.* Picornavirus symmetry. *Virology* 22, 156 (1964).
- McDonald, J. C., Miller, D. L., Zuckerman, A. J. en Pereira, M. S.* Coe (Coxsackie A 21) virus, para-influenza virus and other respiratory virus infections in the R.A.F., 1958-60. *J. Hyg. Camb.* 60, 235 (1962).
- Melnick, J. L.* Advances in the study of enteroviruses. *Progr. in Med. Virology* 1, 59 (1958).
- Mietens, C., Hummeler, K. en Henle, W.* Recall of complement fixing antibodies to enteroviruses in guinea pigs. *J. Immunol.* 92, 17 (1964).
- Moore, M. L., Hooser, L. E., Davis, E. V. en Siem, R. A.* Comparative growth of prototype enteroviruses in embryonic mouse and embryonic human lung tissue cultures. *J. Infect. Dis.* 114, 189 (1964).
- Mufson, M. A., Johnson, K. M., Bloom, H. H. en Chanock, R. M.* Multiplication and cytopathology of Coxsackie A-21 virus in rotated and stationary tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 110, 198 (1962).
- Munch, B. S.* On the specificity of complement fixation tests for typing of Coxsackie virus strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinav.* 56, 89 (1962).
- Neva, F. A. en Malone, M. F.* Specific and cross reactions by complement fixation with Boston exanthem disease virus (Echo 16). *J. Immunol.* 83, 645 (1959).
- O'Connor, J. R. en Morris, J. A.* Recovery of Texas-1 type Coxsackie virus from blood of wild rabbit and from sewage contaminating rabbits feeding ground. *Am. J. Hyg.* 61, 314 (1955).
- Pappenheimer, A. M., Kunz, L. J. en Richardson, S.* Passage of Coxsackie virus (Connecticut - 5 strain) in adult mice with production of pancreatic disease. *J. Exper. Med.* 94, 45 (1951).
- Parsons, R., Bynoe, M. L., Pereira, M. S. en Tyrrell, D. A. J.* Inoculation of human volunteers with strains Coe virus isolated in Britain. *Brit. Med. J.* I, 1776 (1960).
- Patel, N., Buthala, D. A. en Walker, J. S.* Controlled studies of Coxsackie A-21 (Coe) virus in volunteers. *J. Infect. Dis.* 114, 87 (1964).
- Pereira, M. S. en Pereira, H. G.* Coe virus. Properties and prevalence in Great Britain. *Lancet* II, 539 (1959).
- Ploeg, G. C. J. van der.* Infecties met adeno-virussen bij kinderen. Dissertatie Nijmegen (1959).
- Pohjanpelto, P.* Coxsackie antibodies in domestic animal and Norway rats. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 34, 390 (1956).

- Prins, A.* Epidemiologisch onderzoek over infecties door adeno-virus en Aziatische influenza bij militairen. Dissertatie Nijmegen (1959).
- Rosen, L.* A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *Am. J. Hyg.* 71, 120 (1960).
- Schmidt, N. J., Fox, V. L. en Lennette, E. H.* Immunologic identification of Cocksackie A-21 with Coe-virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 107, 63 (1961).  
— Studies on the hemagglutination of Coe (Cocksackie A 21) virus. *J. Immunol.* 89, 672 (1962).
- Schmidt, N. J., Dennis, J., Hoffman, M. N. en Lennette, E. H.* Inhibitors of Echovirus and Reovirus hemagglutination. I. Inhibitors in tissue culture fluids. *J. Immunol.* 93, 367 (1964).
- Shaw, M.* Cultivation of Cocksackie virus in embryonated eggs and in chick tissue cultures. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 79, 718 (1952).
- Sickles, G. M., Mutterer, M., Feorino, P. en Plager, H.* Recently classified types of Cocksackie virus, group A. Behaviour in tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 90, 529 (1955).
- Sickles, G. M., Mutterer, M. en Plager, H.* New types of Cocksackie virus, group A. Cytopathogenicity in tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 102, 742 (1959).
- Slater, E. A. en Syverton, J. T.* The cultivation of Cocksackie virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 74, 509 (1950).
- Smeur, F. A. A. M.* Infecties met para-influenzavirussen bij kinderen. Dissertatie Nijmegen (1961).
- Spickard, A., Evans, H., Knight, V. en Johnson K. M.* Acute respiratory disease in normal volunteers associated with Cocksackie A-21 viral infection. III. Response to nasopharyngeal and enteric inoculation. *J. Clin. Invest.* 42, 840 (1963).
- Underwood, G. E., Wisner, C. A., Weed, S. D. en Gray, J. E.* Coe virus: growth characteristics in HeLa cells and in mice. *Am. J. Hyg.* 76, 124 (1962).
- Veen, J. van der.* Een vereenvoudigde reactie van Wassermann in plastic platen. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* 97, 949 (1953).
- Veen, J. van der, Bots, L. en Mes, A.* Establishment of two human cell strains from kidney and reticulosarcoma of lung. *Arch. ges. Virusforsch.* 8, 230 (1958).
- Veen, J. van der en Heyen, C. F. A.* Lens cells of the calf in continuous culture. *Nature* 183, 1137 (1959).
- Veen, J. van der, Oei, K. G. en Prins, A.* Isolatie van Coe-virus bij patiënten met een acute aandoening van de luchtwegen. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* 104, 617 (1960).
- Wallis, C. en Melnick, J. L.* Cationic stabilization. A new property of enteroviruses. *Virology* 16, 504 (1962).
- Wenner, H. A.* Problems in working with enteroviruses. *Ann. New York Acad. Sci.* 101, 343 (1962).

# STELLINGEN

## I

Voor de virologische diagnostiek van luchtweginfecties bij kinderen is het aan te bevelen keelsekreet direkt in celkweken te enten, daar op deze wijze het aantal positieve isolatieproeven groter is dan bij enting van het materiaal na bewaren bij lage temperatuur.

## II

Bij de behandeling met corticosteroiden dient men er rekening mee te houden, dat onder invloed hiervan de produktie van interferon bij virusinfecties wordt geremd en dat ten gevolge hiervan een afweermechanisme tegen het virus wordt uitgeschakeld.

## III

Bij transplantatie van een nier van een gezonde donor moet het nierweefsel tevoren worden onderzocht op cytomegalovirus.

Hedley-Whyte, E. T. e.m. (1965) New Engl. J. Med. 272, 473.

## IV

De opvatting van Ehrenkranz, dat het verdwijnen van op het neusslijmvlies geïmplanteerde stafylokokken mede berust op een immunologische reactie, blijft onbewezen.

Ehrenkranz, N. J. (1966) J. Immunol. 96, 509.

## V

Massa-vaccinatie van de bevolking mag niet als de methode worden beschouwd om infectieziekten uit te roeien.

## VI

Het is aan te bevelen bij kinderen het urologische onderzoek met behulp van het intraveneuze pyelogram aan te vullen met de miktie cysto-urethrografie, daar bij kinderen anomalieën van de onderste urinewegen vaker voorkomen dan afwijkingen van nieren en ureteren.

Nusslé, D. (1963) Thesis, Bern.





## VII

Een histologische indeling van het carcinoma in situ naar de graad van maligniteit zoals voorgesteld door Old, Wielenga en von Haam, is van betekenis voor het bepalen van de prognose. Het is hiervoor vereist materiaal te onderzoeken, dat verkregen is door middel van conisatie of van portio-amputatie.

Old, J. W. e.m. (1965) Cancer 18, 1598.

## VIII

Om de uitbreiding van de ziekte van Hodgkin vast te stellen is het van belang lymfografisch onderzoek te verrichten.

Roo, T. de (1964) Van Gorcum & Comp. N.V.

## IX

De vermeerdering van mestcellen, die bij parasitaire infecties wordt waargenomen, vormt mogelijk een verklaring voor het frekwent voorkomen van keloïdvorming in tropische landen.

Fernex, M. (1963) Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 4, 325.

## X

Medische hulpverlening aan ontwikkelingslanden, die niet in een sociaal-ekonomisch ontwikkelingsplan is geïncorporeerd, is misplaatst.







